



UNIVERSITAS SCIENTIARUM SZEGEDIENSIS
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Nehézfém-indukált nitro-oxidatív stressz vizsgálata *Brassica* fajokban

Ph.D. értekezés

FEIGL GÁBOR

Témavezetők:

Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsanna
Egyetemi adjunktus

Prof. Dr. Erdei László
Egyetemi tanár

SZTE TTIK

Biológia Doktori Iskola
Növénybiológiai Tanszék
Szeged

2015

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	5
II. Irodalmi áttekintés	7
II.1. A réz és a cink.....	7
II.1.1. Szerepük	7
II.1.2. A réz és a cink felvétele, és homeosztázisuk szabályozása a növényekben	9
II.1.3. A réz és a cink homeosztázisának zavara és következményei.....	11
II.2. A nehézfém-tolerancia szövet- és sejtszintű mechanizmusai	13
II.3. Nehézfém-indukált jelátviteli válaszok	14
II.3.1. A nehézfém stresszre adott direkt válaszok	14
II.3.2. A nehézfémstresszre adott indirekt válaszok	15
II.4. Stressz-indukált morfogenetikai válaszok	15
II.5. A ROF és az oxidatív stressz	17
II.5.1. A ROF képződése	17
II.5.2. A ROF és a biomolekulák reakciója	21
II.5.3. A ROF eliminációjának lehetőségei növényekben	21
II.5.4. Nehézfém-indukált jelátvitel.....	23
II.6. A RNF és a nitrozatív stressz.....	26
II.6.1. A NO tulajdonságai	26
II.6.2. A NO jelátvitele növényekben.....	29
II.6.3. A RNF és a nehézfémek kapcsolata	33
II.7. A ROF és RNF kapcsolata – nitro-oxidatív stressz	34
III. Célkitűzés.....	37
IV. Anyagok és módszerek	38
IV.1. Vizsgált növények és nevelési körülmények.....	38
IV.2. Elemtartalom-vizsgálat.....	39
IV.3. Morfológiai mérések	39
IV.4. Mikroszkópos vizsgálatok.....	40
IV.4.1. Cinklokalizáció a gyökércsúcsokban	40
IV.4.2. Sejtszintű cinklokalizáció meghatározása, a sejtfaak/halott sejtek jelölése	40
IV.4.3. Sejtfalmódosulások vizsgálata a gyökérben.....	41
IV.4.4. Lipidperoxidáció vizsgálata a gyökércsúcsokban	41
IV.4.5. Gyökércsúcsi merisztémák életképességének vizsgálata	42

IV.4.6. Reaktív oxigén- és nitrogénformák kimutatása.....	42
IV.5. Az enzimatis antioxiáns rendszer elemeinek vizsgálata.....	42
IV.6. Immunoprecipitáció, SDS-PAGE és Western blot.....	43
IV.7. Statisztikai analízis.....	43
V. Kutatási eredmények.....	44
V.1. Nehézfémfelvétel.....	44
V.1.1. A réz és a cink felvétele a gyökerekbe, transzport a hajtásba.....	44
V.1.2. A cink szöveti és intracelluláris lokalizációja	47
V.2. Nehézfém-indukált változások a mikroelemek homeosztázisában	49
V.2.1. A réz és cink hatása a mikroelem-homeosztázisra	49
V.3. Réz- és cink-indukált növekedési válaszok	50
V.3.2. A réz és cink hatása a <i>Brassica</i> fajok gyökérnövekedésére.....	52
V.4. Réz- és cink-indukált sejtfalmódosulások	55
V.5. A nehézfém-érzékenység indikátora a gyökércsúcsban – a gyökércsúcsi merisztéma életképessége	58
V.6. Réz- és cink-indukált változások a ROF és RNF egyensúlyában.....	60
V.6.1. A cinkstressz tirozin nitrációt okoz a <i>Brassica</i> fajok gyökerében.....	67
V.6.2. Az oxidatív stressz indikátora - lipidperoxidáció	68
VI. Eredmények értékelése.....	70
VI.1. Nehézfémfelvétel és transzlokáció.....	70
VI.2. Nehézfém-indukált változások a mikroelemek homeosztázisában	72
VI.3. Nehézfém-indukált növekedési változások.....	73
VI.4. A réz és a cink eltérő sejtfalmódosulásokat okoz a <i>Brassica</i> fajok gyökereiben	74
VI.5. A réz és a cink eltérő mértékben csökkenti a gyökércsúcsi merisztéma életképességét	75
VI.6. Nehézfém-indukált változások a ROF és RNF metabolizmusában	75
VII. Összefoglalás	80
VIII. Summary.....	82
IX. Irodalomjegyzék.....	84
X. Publikációs lista	103
XI. Köszönetnyilvánítás	108

Rövidítések jegyzéke

APF - 3'-(p-aminofenil) fluoreszcein
APX – aszkorbát peroxidáz
ATP – adenzin-5'-trifoszfát
ATX1 – antioxidáns protein 1
BH₄ – tetrahidrobiopterin
Ca – kalcium
cADPR – ciklikus adenzin-difoszfát- ribóz
CCH – „ATX-Like Copper Chaperone”
Cd – kadmium
cGMP - ciklikus guanozil monofoszfát
Ctr/COPT – réz felvételéért felelős fehérjecsald
Cu – réz
CCS – „Copper Chaperone for Superoxide dismutase”
DAF-FM DA - 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreszcein
DHE – dihidroetídium
DNS – dezoxiribonukleinsav
FAD – flavin adenin dinukleotid
FDA – fluoreszcein diacetát
Fe – vas
FMN – flavin mononukleotid
GC – guanilát cikláz
GSH – glutation (redukált)
GSNO – S-nitrozoglutation
GSNOR – S-nitrozoglutation-reduktáz
GSSG – oxidált glutation
H₂O₂ – hidrogén-peroxid
HMA – nehézfém ATP-áz
ICP-MS - induktívan csatolt plazma tömegspektrometria
KAT – kataláz
kDa – kilodalton
MAPK – mitogén-aktivált protein kináz
MMK – „multiple-mitotic” kináz

NADPH – redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NO – nitrogén-monoxid
NOS – nitrogén-monoxid- szintáz
 $O_2^{\cdot -}$ - szuperoxid gyökanion
 OH^{\cdot} - hidroxilgyök
PAA1 / PAA2 - P-típusú ATPáz 1 és 2
PI – propídium-jodid
ppm – az egész milliomod része
PRX – peroxiredoxin
PSII – kettes fotorendszer (víz-plasztokinon oxidoreduktáz)
PTM – poszttranszlációs módosítás
RNF – reaktív nitrogénformák
RNS – ribonukleinsav
ROF – reaktív oxigénformák
RubisCo – ribulóz-1,5-biszfoszfát karboxiláz/oxigenáz
sGC - szolubilis guanilát cikláz
SIMK – stressz-indukált MAPK
SIMV – stressz-indukált morfogenetikai válasz
SOD – szuperoxid dizmutáz
SPL 7 – „Spotted Leaf 7”
SZT – száraz tömeg
ZIP – leucin „zipper”
Zn – cink

I. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben a különböző geológiai és antropogén hatások miatt a környezetbe került nehézfémek mennyisége radikálisan megemelkedett, így azok többé már nem elhanyagolható stresszfactorok a növények számára. Minden növény képes a számukra esszenciális fémek felvételére és akkumulációjára (pl. réz, mangán, cink), de olyan, nem-esszenciális elemek felvétele is megtörténik, amelyeknek nincs ismert biológiai funkciója, vagy károsak lehetnek a növényi szervezetekre nézve. A nehézfémstressz – az egyéb stresszorokhoz hasonlóan – morfológiai változásokat indukál a növény hajtás- illetve gyökérrendszerében (stressz-indukált morfogenetikai válaszok). Mivel a gyökér az első növényi szerv ami a talajoldatban található nehézfémekkel találkozik, így alapvető fontossággal bír a stresszválaszok tanulmányozása során, ezért elsősorban a gyökérrendszerben tapasztalható változások vizsgálatát tűztem ki kutatásom céljául.

Az általam vizsgált két nehézfém, a réz és a cink esszenciális mikroelem, ám míg a réz redox-aktív (azaz közvetlenül képes reaktív oxigénformák képzésére), addig a cink nem rendelkezik ezzel a tulajdonsággal. Magas koncentrációban mindkettő negatív hatással van a gyökér merisztematikus zónájának életképességére, és így a csökkenthetik a gyökérnövekedést, illetve így az egész növény növekedésére negatív hatást gyakorolhatnak. Megfelelő koncentrációban azonban a cink pozitív hatással van a növekedésre, illetve a réz serkentheti új merisztematikus régiók és így új oldalgyökerek kialakulását is. A gyökérfejlődést befolyásoló hatásuk mögött többek között a reaktív oxigén (pl. hidrogén-peroxid, szuperoxid gyökanyon)- és nitrogénformák (pl. nitrogén-monoxid, peroxinitrit) metabolizmusának megváltozása áll.

A reaktív oxigénformák (ROF) termelődése a stresszválaszok széles körű kifejeződéséhez kapcsolható, így feltételezhetően azok fontos közvetítő szerepet töltenek be a nehézfémstressz és a stressz-indukált morfogenetikai válaszok kialakulásában, valamint több ponton kapcsolódnak a reaktív nitrogénformák (RNF) jelátviteléhez. Az RNF által kiváltott tirozin nitráció mint poszttranszlációs módosítás során a peroxinitrit reagál a tirozin aminosavakkal, módosítva a fehérjék szerkezetét, aktivitását. Ezeken kívül a nitrogén-monoxid (NO) mobilis jelmolekulaként is fontos szerepet játszik a gyökérfejlődésben és növekedésben.

A ROF és RNF metabolizmusa számos ponton kapcsolódik egymáshoz, emiatt összesített hatásuk jellemzésére a közelmúltban a növénybiológia területén is megjelent a nitro-oxidatív stressz koncepciója, aminek segítségével új formában jellemezhető például a nehézfémek gyökerekre gyakorolt hatása.

Kutatásaim során a réz és a cink hatását hasonlítottam össze indiai mustár (*Brassica juncea* L. Czern.) és olajrepce (*Brassica napus* L.) növényekben. A két, keresztesvirágúak családjába tartozó faj nagy gazdasági jelentőséggel bír, széles körben termesztik őket olajnövényként, így különösen fontos az abiotikus stressz-toleranciájuk – jelen esetben nehézfém-toleranciájuk – jobb megismerése, összehasonlítása. Gazdasági hasznosításuk mellett léteznek kezdeményezések ezen *Brassica* fajok fitoremediációs felhasználására vonatkozóan is, így a (haszon)növények nehézfém-toleranciájára vonatkozó ismereteink bővítése igen fontos lehet a jövőre nézve, a környezet nehézfém-mel való egyre fokozódó szennyezése miatt.

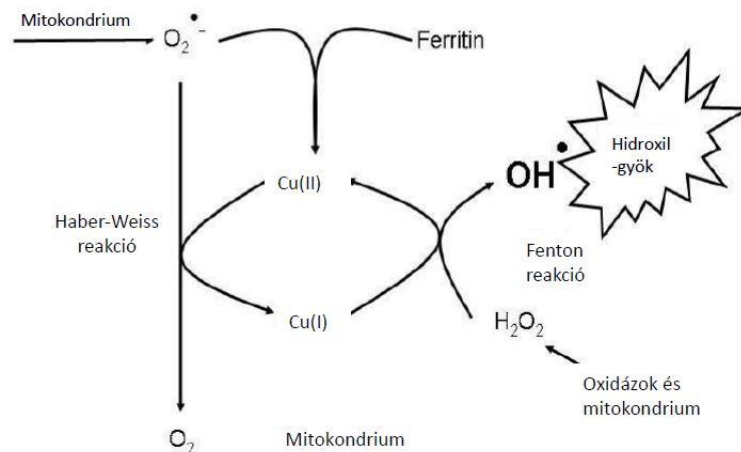
Kísérleteimben a réz- és cinkkezelésnek alávetett *Brassica* növények gyökereiben történő válaszait tanulmányoztam morfológiai, biokémiai és molekuláris szinten. Megtörtént a nehézfém-stressznek kitett növények fémfelvételének, valamint mikroelem-háztartásának vizsgálata, tanulmányoztam a nehézfém-indukált morfogenetikai válaszok kialakulását, valamint az ezek háttérében húzódó folyamatokat, mint a sejtfalmódosulásokat vagy a ROF és RNF kapcsolatát és kölcsönhatását *in situ* és *in vivo* fény-, fluoreszcens és konfokális mikroszkópiás módszerekkel, illetve a ROF és RNF metabolizmusában kulcsfontosságú enzimikus antioxidánsokat fotometriás módszerrel. A nitrozatív stressz markereként Western blot technikával vizsgáltam a fehérje tirozin nitráció kialakulását a réz-, illetve cinkkezelt növények gyökereiben.

II. Irodalmi áttekintés

II.1. A réz és a cink

II.1.1. Szerepük

A réz, bár a növények számára esszenciális mikroelem, nehézfém tulajdonsága miatt, amennyiben felvehető formában fordul elő a talajban, képes pozitív illetve negatív hatást gyakorolni a növények fejlődésére. Talajokban átlagosan 1-191 mg/kg réz található (Stefanovits és mtsai, 1999), ennek koncentrációját alapvetően az anyakőzet típusa valamint számos biotikus és abiotikus tényező határozza meg. Az abiotikus tényezők között szerepel a fém vízdékonysága vagy komplexképző képessége (Láng 2002), miközben a biotikus tényezők között tartjuk számon a növények hatását a talajra, ahol a legfontosabb a szerves savak kiválasztása; a réz talajokból alacsony pH értéken vehető fel. Hazánkban a környezet megemelkedett rézterhelése csak ipari területek, vegyipari üzemek körzetében figyelhető meg (Ötvös és mtsai, 2003). A réz a növények növekedéséhez nélkülözhetetlen, hiányában olyan hiánytünetek alakulnak ki, mint a növekedésgátlás, levelek elsárgulása, levélszélek görbülése, termés méret csökkenése, valamint az apikális merisztéma vagy a reprodukív szövetek életképességének csökkenése. A réz redox-aktív tulajdonságokkal rendelkező fém, azaz két, egymásba alakulni képes, oxidált (Cu II) és redukált (Cu I) állapotban is előfordul, emiatt gyakran megtalálható enzimekben mint kofaktor. Redox-aktivitását a növények többnyire elektrontranszport-láncokban, redox reakciókat katalizáló enzimekben és oxidációs folyamatokban hasznosítják. Ezek az enzimek döntő szerepet játszanak a sejtfal szintézisében, az elektrontranszport-láncban, a molibdén kofaktor képzésében és az etilén-indukált jelátviteli útvonalban (Burkhead és mtsai, 2009). Redox aktivitása révén azonban közvetlenül ROF képződéséhez vezet a Haber-Weiss és a Fenton-reakció során. A Haber-Weiss reakcióban (Halliwell és Gutteridge, 1984) a réz a szuperoxid gyökönion elektronját felvéve redukálódik, így egyrészt oxigén képződik, másrészt a redukált rézion a Fenton-reakción keresztül oxidálja a hidrogén-peroxidot, így magas reaktivitású hidroxilgyök keletkezik (1. ábra).



1. ábra: A réz, mint redox-aktív fém által katalizált hidroxilgyök képződés folyamata (Kell, 2009).

A cink a legtöbb eukarióta szervezet, így a növények számára is esszenciális mikroelem, azonban többletben káros hatással van rájuk. Ismertek olyan kovamoszatok, amelyek alacsony cinktartalmú környezetben képesek helyette kadmiumionokat hasznosítani enzimeikben kofaktorként (Lane és Morel, 2000). A talajok cinktartalma megfelelő a szárazföldi növények számára, így ebben a csoportban ilyen kivétel nem található. A cink a természetes közetekben szabadon fordul elő, a talajban történő felvételét azonban befolyásolhatja a talajkolloidokhoz való kötöttsége.

Az eukarióta sejtekben a cink kitüntetett szerepű mikroelem, mivel kofaktorként betöltött szerepe mellett képes befolyásolni a génexpressziót és a metabolikus folyamatokat is (Cakmak és Marschner, 1992); fontosságát jól jelzi, hogy az eukarióta proteom körülbelül kilenc százaléka tartalmaz cinket (Andreini és Bertini, 2009). A növekedés szempontjából az auxin szintézisében betöltött szerepe mellett a sejtosztódást befolyásoló képessége teszi fontossá, miközben a sejt energiatermelő folyamatai közül a fotoszintézis szabályozásában vesz részt, többek között a fotoszintetikus pigmentekkel való kölcsönhatás, a fotoszintetikus elektrontranszportlánc és a RubisCo aktivitásán keresztül (Krupa és Baszynski, 1995; Shier, 1994). A nukleinsavak képződése mellett hatása van a fehérjeszintézisre is, itt a riboszómák integritásáért felelős. Befolyásolja más elemek mennyiségét a szövetekben, például a nitrogén felhasználását a vegetatív szövetekben, vagy annak és a foszfornak a bejutását a fejlődő magokba. Emellett számos metalloproteinben és metalloenzimben is megtalálható, ezeknek gyakran az aktív centrumában lokalizálódik, meghatározva az enzimműködést, esetleg a fehérjék szerkezetének fenntartásában játszik szerepet (Hewitt, 1983). A legfontosabb szerepe

talán a transzkripció iniciálásában és az RNS-írásban van, mivel a legtöbb nehézfémmel ellentétben nincsenek különböző redox-állapotai, csupán oxidált formában fordul elő, így alkalmazása biztonságosabb cink ujj domént tartalmazó transzkripciós faktorokban, illetve az RNS-polimeráz kofaktoraként (Maret, 2009).

II.1.2. A réz és a cink felvétele, és homeosztázisuk szabályozása a növényekben

A réz felvehetősége a növény számára függ az alkalmazott közeg tulajdonságaitól. A legjobb hozzáférhetősége a hidropónikus körülmények között van, az agarral szilárdított táptalajokban megkötődhet az agaron, azonban még így is jobban felvehető, mint a természetes talajokból. A közeg minősége mellett annak pH értéke is fontos szereppel bír, a savas közeg szolubilizálja a szerves anyagokhoz kötött rézet, ionos formában felvehetővé téve azt. A lúgos pH csapadékképző hatással bír, a réz ebben a kötött formában nem felvehető (Carrillo-González és mtsai, 2006). A fémek felvételének könnyítése érdekében a növények és egyes mikorrhiza gomba fajok képesek fémkelátoló anyagok kiválasztására, melyek lehetnek aminosav-származékok, polipeptidek, szerves savak vagy fitosziderofórok. A rizoszférába kiválasztott molekula kölcsönhatásba lép a fémionokkal, és megkötve őket segíti a felvételüket.

Az ionok bejuttatását a növényi sejtbe a plazmamembránon található transzporterek végzik, és a réz felvételéért a Ctr/COPT fehérjecsald a felelős (Kampfenkel és mtsai, 1995; Sancenon és mtsai, 2003, 2004). Ezekre a fehérjékre három transzmembrán domén a jellemző, extracelluláris térbe nyúló N-terminálisukon a beszállítandó rézion megkötéséért felelős metioninban gazdag régió található. A transzporterek trimerként, ATP-független módon, a koncentrációgrádiens kihasználásával szállítják a rézet a sejtbe. A Ctr-ek csak a redukált Cu (I)-et képesek felvenni, a talajokban megtalálható oxidált Cu(II) felvételének lehetővé tétele a sejtfelszínen megtalálható vas-reduktáz enzim feladata (Robinson és mtsai, 1999). A sejtbe bejutott réz vagy a sejtorganellumokba szállítódik, vagy tovább transzportálódik az intercelluláris térbe. A citoplazmában az ionok megkötéséről a fitokelatinok és a metallochaperonok gondoskodnak, utóbbiak közül a szimplasztban aktív CCH (ATX-Like Copper Chaperone) és ATX1 (Antioxidant Proteine 1), valamint a réz-cink SOD-t rézzel ellátó CCS (Copper Chaperone for Superoxide dismutase) rendelkezik bizonyított rézmegkötő aktivitással (Himelblau és mtsai, 1998). A plasztiszok megfelelő rézellátottsága létfontosságú a növények számára, erről két, eltérő lokalizációjú P-típusú ATP-áz, a PAA1 és PAA2 (P-

típusú ATPáz 1 és 2) gondoskodik. A felesleges, sejten belüli rézet a vakuólumba szállítják a különböző, egyelőre nem azonosított chaperon fehérjék, amik aktivitása alapján egyszerre csupán néhány rézion mozoghat a sejtekben egyszerre. A sejtekből a xilémbe átlépő réz szállítása általában kelátolt formában történik, ilyen kelátorok a más mikroelemek szállításáért is felelős nikotinamid és mugineinsav (Pich és Scholz, 1996).

Mivel a növények rézháztartása szűk optimális koncentrációtartománnyal rendelkezik, így szükség van egy effektív szabályozórendszerre, ami áthidalja az ingadozások okozta károkat. A legegyszerűbb mechanizmus a réz sejten belüli koncentrációjára adott válasz: kevés réz esetén fokozódik a rézfelvételben szereplő transzporterek transzkripciója, míg a magas intracelluláris rézmennyiség leállítja az átírást az SPL 7 (Spotted Leaf 7) transzkripciós faktoron keresztül. Emellett két SOD izoforma, a Cu/Zn és a Fe SOD is a réz koncentrációjának függvényében íródnak át. A réz mennyisége hatással lehet a réz kofaktorrall rendelkező fehérjék szabályozásában is a mikro-RNS rendszeren keresztül, ami az összes nem létfontosságú gént képes lecsendesíteni (Kurepa és mtsai, 1997). Szubletális rézkoncentrációk ellen különböző toleranciamechanizmusok alakultak ki a növényekben, amik segítik az intracelluláris réz mennyiségének csökkentését valamint a stressz toleranciát is. A szabályozás történhet a kiválasztott kelátoló anyagok mennyiségének a csökkentésével, a növényen belüli akkumulációval, a transzporterek mennyiségének csökkentésével és az efflux csatornák aktiválásával, valamint a citoszolikus kelátor molekulák szintézisével (Puig és mtsai, 2007). A fentiekben kívül jellemző védelmi mechanizmus még a sejtfal módosítása, ami egy külső védelmi vonalként képes funkcionálni a sejt körül, fizikailag megakadályozva a réz bejutását. A sejtfalmódosítás két formája ismert nehézfém stressz esetén, a lignifikáció és a kallóz depozíció. A lignifikáció egy olyan sejtfal-vastagodási folyamat, amely során a lakkázok és a lignin-peroxidázok a lignin polimerizációját katalizálják, aminek eredményeképp merevebb lesz a sejtfal, ami a növekedésre is hatással lehet: megváltozhat a gyökérmorfológia (Sasaki és mtsai, 1996). A kallóz berakódását a sejtfalba egy transzmembrán enzim, a kallóz-szintetáz katalizálja, a folyamat révén a sejtfalhoz szénhidrogén-rétegek adódnak hozzá, ami így az ionok számára kevésbé lesz átjárható. A kallóz képes akár a plazmodezmákba is berakódni, így csökkentve a szimplaszt úton érkező réz mennyiségét (Kartusch, 2003).

A rézhez hasonlóan a cink is annak ellenére, hogy nehézfém, homeosztázisa jól szabályozott. Kis mennyiségben esszenciális a növények számára, és mivel nagyobb mennyiségben erősen toxikus, felvétele kontrollált folyamat. Felvételét több tényező is befolyásolja: a talaj

kationkicserélő kapacitása, valamint szervesanyag-tartalma, kémhatása, az esetleges arbuszkuláris mikorrhiza megléte, illetve maga a növény is (Bjerre és Schierup, 1985). A fémionok felvételéhez a jobb oldhatóságuk miatt a savas pH az optimális, azonban a cink lúgos pH tartományban is nagyobb mennyiségben felvehető a talajból, a nagyméretű fémiontartalmú szervesanyag-komplexek szétesése miatt. A felvételt a növény ennél komplexebb módon szabályozza. Számos fehérje képes a cink felvételére, amiknek aktivitása elősegíthető a gyökér által a környezetbe kiválasztott kelátorokkal. A legfontosabb felvételben szerepet játszó transzporterfehérje-család a ZIP (Leucin Zipper) fehérjék csoportja, ebből *Arabidopsis*-ban 15 ismert (Colangelo és Guerniot, 2006), valamint fontosak még a nehézfém-ATP-áz (HMA) fehérjék is, amelyek a fémionok sejtekből történő eltávolítását végzik, emellett fontosak a szállítónyalábok feltöltésében is.

II.1.3. A réz és a cink homeosztázisának zavara és következményei

Epstein és Bloom (2005) szerint a növényekben átlagosan 2-50 µg réz található egy gramm száraz tömegben. Hiánytünetek 5 µg/g mennyiség alatt, míg toxicitási tünetek általában 20 µg/g jelentkeznek (Marschner, 1995). Nagyobb mennyiségben a réz toxikus hatással van a növényi szervezetre nézve. A talaj bizonyos mértékben képes pufferelni a nagy mennyiségben előforduló rezet, azonban azt meghaladva káros lehet a növények számára, bár ismertek a rezet jól tűrő, hiperakkumuláló növények is. Hiperakkumuláló növények nevezzük azt a fajt, ami képes száraz tömegének több mint 0,1%-át felvenni az adott nehézféméből (Clemens, 2001). Toxikusságát általában három hatásmechanizmuson keresztül fejti ki: képes közvetlenül kapcsolatba lépni a fehérjékkel, előidézheti ROF képződését, valamint megzavarhatja más, esszenciális kationok metabolizmusát és funkcióját (Sharma és Dietz, 2008). A fehérjékkel általában azok hisztidil-, karboxil- és tiol-csoportjain keresztül lép kölcsönhatásba, a kölcsönhatás helye gyakran a fehérjék aktív centrumába esik, így csökkentve azok katalitikus aktivitását. Abban az esetben, ha fémtartalmú fehérje a célpont, az eredeti ion helyettesítése esetén további fémion-felszabadulás is bekövetkezhet, ezzel erősítve a hatást. Amennyiben nagy mennyiségű réz jut a sejtmagba, az örökítő anyag és a génexpresszió is károsodhat, a DNS bázisainak módosulása, új keresztkötések kialakulása valamint száltörések bekövetkezése miatt (Briat és Lebrun, 1998). A réztöbblet képes károsítani más esszenciális fémionok metabolizmusát. Ismert például, hogy magas rézkoncentráció mellett a növény fiziológiás vashiányban szenved, ami miatt lassul a

porfirinváz szintézise, így sérül a fotoszintetikus apparátus. A réz által okozott sejtszintű változások között megemlíthető a sejtfal vastagodása valamint összetételének változása, a kloroplasztiszok számának növekedése és méretüknek csökkenése, valamint a vashiányra visszavezethető érközi sárgulás a leveleken (Bernal és mtsai, 2006). A rézstressznek kitett növények összességében általában alacsonyabbak, száruk vastagabb, kevesebb oldalgyökérrel és vastagabb főgyökérrel rendelkeznek (Reichman, 2002).

Más nehézfém-ionokhoz hasonlóan a cink többletfelvétele is számos toxicitási tünetet okozhat a növényekben; általában 15-20 mg található egy kg száraz növényi szövetben, toxicitási tünetek 100-300 mg/kg mennyiségtől jelentkeznek (Marschner, 1995). A növényekre kockázatos többlet cink elsődlegesen a talajból származik, aminek szennyeződése számos forrásból eredhet. A természetes cinkforrások, mint a vulkáni tevékenység vagy épp a kőzetek eróziója évente akár 45 millió tonna cinket juttatnak a környezetbe (Pacyna, 1986), de az ipari szennyező források ennél jóval nagyobb mennyiségű cinkterhelésért felelősek (Verkleji, 1993). Az ipar mellett nem elhanyagolható a mezőgazdaságban alkalmazott permetszerekből és műtrágyákból, vagy épp a magas tápanyagtartalma miatt mezőgazdasági termelésben felhasznált szennyvíziszapból hosszú idő alatt a környezetben felhalmozódó cinkszennyezés sem (Kádár, 2013).

A talajok magas cinktartalmának következtében a növényekben számos általános toxicitási tünet léphet fel: csökkent biomassza, klorózis és nekrosis a leveleken, csökkent fotoszintetikus aktivitás, genotoxicitás, más mikroelemek homeosztázisának vagy transzportjának felborítása. Sejtszinten a cink egyik legkárosabb hatása a lipidek oxidációja és az emiatt bekövetkező membrán-destabilizáció; ez a plazmalemmán kívül kihatással van a mitokondrium összetett membránstruktúráira is, amelyek károsodása az energiatermelő folyamatok megzavarását, így energiahányt okoz a sejtben. Emellett a kloroplasztisz tilakoidmembrán-rendszere is károsodhat, de a szén-dioxid : oxigén arány megváltoztatásával a cink a fotoszintetikus aktivitást közvetlenül is csökkentheti. Az egész sejtre jellemző a különböző enzimek inaktíválódása, a tiol-csoportok nehézfém kötése által, mégis a cink hatására a nukleuszban lejátszódó genotoxikus folyamatok a legkárosabbak a sejtre nézve. Létrejöhetnek kromoszóma-aberrációk, kromatinkondenzáció, és a membrán destabilizációja megzavarja a normális kromoszómaműködést. A mikroelemek közül a vas, réz, mangán, foszfor, kalcium, kálium és magnézium háztartása is megváltozhat, komoly hiánytüneteket

idézve elő (Rout és Das, 2003). A másodlagos hatások közül igen fontos továbbá a cinktöbblet által kiváltott oxidatív stressz.

II.2. A nehézfém-tolerancia szövet- és sejtszintű mechanizmusai

Mivel mindkét általam alkalmazott nehézfém esszenciális nyomelem a növények számára, ebből fakadóan a növények ezekkel szemben tanúsított toleranciája minden esetben a lokális koncentráció veszélyes szint alá történő csökkentésén alapul. Erre a feladatra a növények három stratégiát alkalmaznak, az elkerülést, a transzlokációt, valamint a megkötést.

Az elkerülés a legalapvetőbb és valószínűleg a legegyszerűbb stratégia, ami során a magas külső koncentráció esetén a növény csökkenti az adott nehézfém felvételét a gyökérbe, ily módon a szövetekbe már kontrollált, megfelelő mennyiségű jut be, ami nem okoz károsodást. A mechanizmus hátránya, hogy a folyamat során más mikroelemek felvételében is változás állhat be, ami miatt akár hiánytünetek is kialakulhatnak (Lewitt, 1980).

Amennyiben a növény nem képes elkerülni a nehézfémekben gazdag közeget, akkor az egész növényen belüli hatékony eloszlása szintén növelheti a toleranciáját. A *Noccaea caerulescens* (tarsóka) például nehézfémstressz hatására nagy mennyiségben expresszál transzportereket (pl. HMA 4-et), amik segítségével gyorsan feltölti a szállítónyalábokat fémionokkal. A hajtásba szállítás hosszú távon bár nem a legmegfelelőbb megoldás, de raktározó kapacitásának felhasználásával a lokális nehézfém-koncentrációk a toxikus szint alatt maradhatnak (Baker, 1978).

A sejtszinten történő nehézfém-megkötés igényli a legtöbb energiát, melyre számos mechanizmus létezik. Az első védelmi vonal a növényi sejtek sejtfala, amiben a poliszacharidok és a többi sejtfal-alkotó nagy mennyiségű nehézfém megkötésére képes; az átjárhatóságának csökkentésének érdekében új komponensek, a már említett kallóz és/vagy lignin rakódhat be a sejtfalba (Turner és Marshall, 1972). Amennyiben a nehézfém bejut a sejt citoplazmájába, az elsődleges cél a természetes, nanomólos koncentráció fenntartása, amit megkötéssel, kompartmentalizációval, vagy a sejtbe befelé irányuló transzporterek aktivitásának csökkentésével érhet el a sejt. A megkötésben számos kelátormolekula vesz részt, ilyenek a metallothioneinek, a glutation, a fitokelatinok (Rauser, 1984), bizonyos szerves savak és aminosavak is (Herstein, 1986). Ezeken kívül optimális esetben aktiválódnak

a sejtből kifelé irányuló HMA pumpák is, amik szintén csökkentik az intracelluláris nehézfém-koncentrációt.

A növények nehézfém-toleranciájának hátterében mindhárom stratégia elterjedt, azonban ezeknek többnyire a kombinációit alkalmazzák. Ha egy növény több stratégia alkalmazására is képes, általában nagy mennyiségű fémot képes jelentős károsodás nélkül felvenni és tárolni, ezeket a növényeket nevezzük akkumuláló, extrém esetben hiperakkumuláló növényeknek.

II.3. Nehézfém-indukált jelátviteli válaszok

A nehézfémstressz az egyik legjelentősebb abiotikus stresszfaktor, ami veszélyes állapotok kialakulásához vezet mind növényekben, mind állatokban. A magas reaktivitásuk miatt közvetlenül befolyásolhatják a növekedést, szénészenciaciát és energiaképző folyamatokat is (Maksymiec, 2007).

II.3.1. A nehézfém stresszre adott direkt válaszok

A növekedést gátló, valamint a sejthalált elősegítő folyamatok hátterében több mechanizmust azonosítottak, például a nehézfémek képesek a tilakoidmembrán különböző, a fotoszintetikus aktivitás fenntartásához nélkülözhetetlen fehérje- és lipidkomponenseit felszabadítani (Maksymiec és Baszynski, 1988; Skórzynska és Baszynski, 1993; Nouari és mtsai, 2006). Szintén ismert, hogy a feleslegben jelen lévő nehézfémek képesek a membrán foszfolipidekhez kötödni oxigénatomokon (Vierke és Struckmeier, 1977), vagy hisztidin, triptofán és tirozin aminosavakon (Maksymiec, 1997) keresztül, ezáltal megzavarva az elektronáramlást a PSII reakciócentrumban. Más kutatások szerint a nehézfémek képesek helyettesíteni a klorofill központi magnéziumát (Kowalewska, 1987); valamint a klorofillszintézis is károsodhat az azért felelős enzimek gátlása miatt (Böddi és mtsai, 1995). Összességében a fotoszintetikus aktivitás csökkenése a pigment protein komplex és a tilakoidok összeszerelődésének megzavarásán keresztül valósul meg, oxidatív stressz különösebb megjelenése nélkül (Linger és mtsai, 2005).

II.3.2. A nehézfémstresszre adott indirekt válaszok

A nehézfémstressz indirekt hatásai között számos mechanizmus szerepel, ilyen például a nehézfém-indukált mikroelemhiány és azok hatása a növekedésre (Siedlecka, 1995), azonban ezen általános hatás mellett az is ismert, hogy nem minden nehézfém okoz ugyanolyan növekedési változásokat. Az ólom (Wierzbicka, 1999), higany (Patra et al 2004) és a kadmium (Vecchia és mtsai, 2005) határozott csökkenést okoz a mitotikus indexben, valamint a réz (Maksymiec és mtsai, 1995) és a kadmium (Poschenrieder et al 1989) gátolják a levél megnyúlásos növekedését a sejtfal elaszticitásának csökkentése révén. Ezek a hatások általában pár nappal a nehézfém kezelés után jelentkeztek, előtte nem volt semmilyen mérhető változás a sejtekben. A nehézfémek indirekt hatásainak kifejtésére két alapvető mechanizmus ismert, azok kapcsolata a hormonális jelátviteli útvonalakhoz illetve a ROF által közvetített jelátvitel (Maksymiec, 2007).

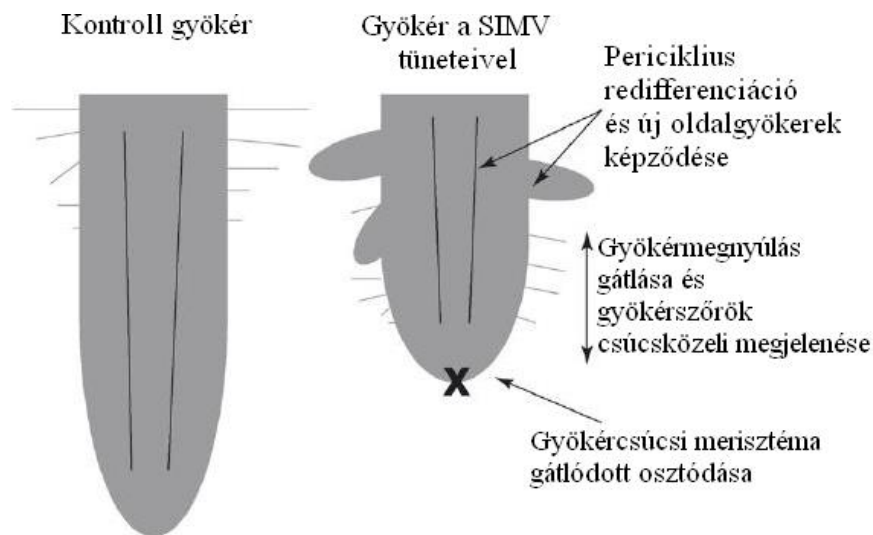
A réz például képes indukálni az etilén szintézisét (Sandmann és Böger, 1980) a fotorendszerek gátlása révén, ami képes elősegíteni a különféle szenescencia-folyamatokat (Maksymiec és mtsai, 1995), de a lignifikáció serkentése révén növeli a sejtfalak rigiditását, ami növekedésgátláshoz vezet (Enyedi és mtsai, 1992). A réz mellett a cink is növeli az etilénképződést. Az etilén mellett a réz és a kadmium bizonyítottan (Agrawal és mtsai, 2003; Maksymiec és mtsai, 2005) képes indukálni a jázmonsav-útvonalat is. A réz- vagy kadmiumstressz hatására tapasztalt kétfázisú jázmonsav-akkumuláció (egy gyors, pár órával a stressz után, majd egy lassú, pár nappal később) lehet a felelős az általában tapasztalt gyors növekedéscsökkenésért, majd a később, hosszabb távon kialakuló szenescencia-folyamatok felerősödéséért (Maksymiec és mtsai, 2005).

A hormonokkal való kölcsönhatások mellett a képződő reaktív oxigénformák -amiket később tárgyalok részletesebben- is hozzájárulnak a nehézfémek hatásának érvényesüléséhez.

II.4. Stressz-indukált morfogenetikai válaszok

A stressz-indukált morfogenetikai válasz (SIMV) egy jellemzően alacsony mértékű, krónikus stresszhatások által kiváltott tünetegyüttes, ami az erős, toxikus mértékű stressznek kitett növényekben nem alakul ki. A krónikus stresszhatások egy speciális fenotípus kialakulásához vezetnek, ami három növekedésbeli változásra vezethető vissza: a sejtmegnyúlás gátlódik,

bizonyos helyeken serkentődik a sejtosztódás, és a sejtek differenciációs állapota megváltozik. A növények a SIMV által a stresszkitettség csökkentésére törekednek, növekedésük átirányításával kikerülhetik a stressz forrását, ami a károsodások kivédésére és javítására kialakult mechanizmusok mellett segíti túlélésüket abiotikus stressz mellett (Potters és mtsai, 2007).



2. ábra: A stressz-indukált morfogenetikai válasz sematikus ábrázolása (Potters és mtsai, 2007). Az elsődleges merisztéma osztódása és a sejtek elongációja gátlódik, valamint indukálódik az oldalgyökök képződése.

A legtöbb nehézfém alacsony koncentráció mellett hosszabb idő alatt képes SIMV kialakítására, ami a gyökérszónát tekintve a gyökérmegnyúlás gátlásában és a megnövekedett oldalgyökér képződésben nyilvánul meg. (2. ábra) Emellett előfordulhat még a gyökerek vastagodása is, ami érintheti a gyökérrendszer sűrűségének valamint a gyökerek átmérőjének növekedését is (Rucinska és mtsia, 1999; Arduini és mtsai, 2004). Bizonyos kutatások alapján a nehézfém-indukált SIMV kialakulása kiterjeszthető a hajtásra is, a gyökér mellett a szár és a hajtás megnyúlása is gátolt, a különböző szervek megnyúlásának csökkenése a sejtmegegyülés gátlására vezethető vissza (Pasternak és mtsai, 2005; Hasnain és Sabri, 1997; Horst, 1995). A SIMV kialakulása nem általános jelenség, nem minden nehézfém és nem bármilyen koncentrációban képes kiváltani, hanem egy bizonyos fokú stressz szükséges hozzá (Ederli és mtsai, 2004). A SIMV kialakulása aktív folyamat, magas stressz mellett nem alakulnak ki a tünetek, ahogy ez látszik a króm-kezelt búza gyökérszámain is, ahol a 250 és 500 $\mu\text{g/ml}$

krómnak kitett növények gyökérszáma 13 és 25%-kal nőtt, míg 1000 µg/ml króm hatására 61%-kal csökkent (Hasnain és Sabri, 1997).

A ROF megnövekedett termelődése általánosan megfigyelt jelenség számos eltérő stresszfolyamatban (Apel és Hirt, 2004), és ezek a sejtkárosító hatásuk mellett jelátviteli funkciót is betöltenek (Mittler, 2002; Foyer és Noctor, 2005). Mivel mind a SIMV, mind a ROF közös komponensei több, egymástól független stresszválasznak, kézenfekvő feltételezni, hogy azok közvetítő szerepet játszanak a stressz és a SIMV fenotípus kialakulása között (Potters és mtsai, 2007). Ezt az elméletet erősíti, hogy rézzel, parakvátal és hidrogénperoxid-származékkal kezelt *Arabidopsis* növények ugyanolyan, SIMV fenotípust mutattak (Pasternak és mtsai, 2005ab). A ROF megváltoztatják a sejtek redoxállapotát az aszkorbát vagy a glutation oxidálásával (Foyer és Noctor, 2005), viszont a redoxállapot egy felületet alkot az auxin és a ROF szabályozott jelátvitel kommunikációjára (Pignocchi és mtsai, 2006). A ROF ezen kívül közvetlenül aktiválnak mitogén-aktivált protein kinázokat, amik többek között a gyökérszőrfejlődés szabályozásához kapcsolnak (Pitzschke és Hirt, 2006).

II.5. A ROF és az oxidatív stressz

Az aerob metabolikus folyamatok és az oxigénben dús környezet szükségszerűen ROF kialakulásához vezetett a mitokondriumokban, peroxiszómákban valamint a kloroplasztiszokban. Ezen molekulák közös tulajdonsága, hogy képesek a sejtben található fehérjék, lipidek és DNS oxidatív károsítására. A citotoxikus hatások kivédésére alakult ki a különböző enzimatis és nem enzimatis detoxifikációs mechanizmusok komplex hálózata, lehetővé téve a ROF keletkezésének és lebontásának egyensúlyban tartását. Egyre több bizonyíték mutat afelé, hogy a ROF jelmolekulákként is szerepelhetnek a sejt életfolyamataiban, szerepet játszva a fejlődés szabályozásában, valamint a patogénekkal szemben kialakuló védekező mechanizmusokban is (Apel és Hirt, 2004).

II.5.1. A ROF képződése

Az alapállapotú triplet molekuláris oxigén egy szabad gyök, a két külső vegyértékelektronjai külön héjakon helyezkednek el, párhuzamos spinnel rendelkeznek. Ahhoz, hogy nem-gyök atomot vagy molekulát oxidálhasson, olyan partnerre van szüksége, amely olyan párhuzamos

spinű elektronpárt képes biztosítani, ami beleillik a szabad elektronhéjaiba. Szerencsére a legtöbb szerves molekula nem rendelkezik a fenti tulajdonságokkal, így kivédve a triplet oxigén káros hatásait (Cadenas, 1989; Halliwell és Gutteridge, 1989).

Az alapállapotú oxigén azonban átalakulhat sokkal reakcióképesebb reaktív oxigénformákká, mind energia-, mind elektrontranszfer révén. Ezek lehetnek szabad gyökök, ilyen a szuperoxid gyökanion, a hidroxil gyök vagy a hidroperoxid gyök, illetve lehetnek nem szabadgyök molekulák, mint a hidrogén-peroxid vagy a szinglet oxigén (Gill és mtsai, 2010).

A fent említett molekulák eltérő kémiai tulajdonságokkal bírnak. A szuperoxid gyökanion rövid féléletidejű ($1\ \mu\text{s}$), mérsékelt reaktív molekula, ami nem képes a membránokon diffúzióval átjutni. A szuperoxid gyökanion egy elektron felvétele és két proton dizmutálódása során könnyen hidrogén-peroxidot képez (Halliwell 2006). A hidrogén-peroxid egy mérsékelt reaktív, viszonylag stabil és hosszú féléletidejű (1 ms) molekula (Karuppanapandian és mtsai, 2011), a membránokon az akvaporinokon keresztül képes átjutni (Pastori és Foyer, 2002). Hidroxilgyök képzésére, valamint az enzimek tiolcsoportjainak oxidálása révén azok inaktiválására is képes; stressz-indukált jelátviteli válaszokban másodlagos hírvívó szerepet is betölt. Kis mennyiségben hírvívó szerepben indukálhatja védelmi gének expresszióját, így aktiválva az abiotikus stresszre adott védelmi válaszokat, emellett magas koncentrációban oxidatív károsodást okozhat (Qiao és mtsai, 2014). A hidroxil gyök nagy reaktivitású oxigénforma, a legtöbb szerves molekulával képes akár nanomásodperceken belül reakcióba lépni, és azokat visszafordíthatatlanul károsítani; képződése oxidatív stresszhez vezethet (Vranová és mtsai, 2002). A szinglet oxigén az alapállapotú oxigén legreaktívabb formája, károsítja a kloroplasztiszt a telítetlen zsírsavakat tartalmazó lipidek oxidációja révén. Nagy reaktivitása miatt sejthalálhoz is vezethet (Halliwell 2006). A hidroperoxid gyök a szuperoxid gyökanion protonálódása révén keletkezik, a membránokon diffúzióval átjutva a lipidek peroxidációjában játszik fontos szerepet (Karuppanapandian és mtsai, 2011).

A növényi szervezetben a ROF folyamatosan képződő melléktermékei a különböző sejtalkotókban zajló metabolikus útvonalaknak (Foyer és Harbinson, 1994). Fiziológias alapállapotban a képződő ROF-at különböző antioxidáns védelmi komponensek kötik meg, amik gyakran egy bizonyos sejtalkotóra specifikusak (Alscher és mtsai, 1997).

A ROF keletkezése és semlegesítése közötti egyensúlyi állapotot számos környezeti faktor megzavarhatja. Ezen zavarok következtében azok sejten belüli szintje gyorsan

megemelkedhet (Elstner, 1991; Malan és mtsai, 1990; Prasad és mtsai, 1994; Tsugane és mtsai, 1999). A növények képesek ROF termelésére a különböző oxidázok és peroxidázok aktiválása révén, válaszképp különböző környezeti változásokra (Allan és Fluhr, 1997; Bolwell és mtsai, 1998, 2002; Doke 1985, Schopfer és mtsai, 2001); ezek szintjének gyors emelkedése az úgynevezett oxidatív robbanás (Apostol és mtsai, 1989).

II.5.1.1. Abiotikus stressz által indukált ROF képződés

A különböző abiotikus stresszfolyamatok közös tulajdonsága, hogy a stressznek való kitettség valamely fázisában megnő a ROF mennyisége a növényi szervezetben (Schützendübel és Polle, 2002). A növényekben folyamatos a ROF keletkezése, elsősorban a kloroplasztisban, mitokondriumban és a peroxiszómákban. Képződésük és eltávolításuk szigorúan szabályozott folyamat kell legyen, azonban az egyensúlyt megzavarhatja számos abiotikus stresszfaktor, úgy mint a magas fényintenzitás, szárazság, alacsony vagy magas hőmérséklet, mechanikai- vagy épp nehézfémstressz (Elstner, 1991; Malan és mtsai, 1990; Prasad és mtsai, 1994; Tsugane és mtsai, 1999).

II.5.1.2. Nehézfém-indukált ROF képződés

A növényi sejten belüli oxidatív stresszhez vezető redox-egyensúly felborulása és a nehézfémtoxicitás közötti kapcsolatot intenzíven tanulmányozták az elmúlt évtizedekben. Eleinte főleg indirekt kapcsolatot feltételeztek a nehézfémek és sejtkárosodások között, azonban az újabb eredmények egyértelmű kapcsolatot tártak fel a nehézfémstressz és a redoxháztartás, valamint az antioxidáns kapacitás között (Sharma és Dietz, 2008).

II.5.1.2.1. A ROF képződése réz és cinkstressz során

Az összes felhasznált oxigén egy része (például az izolált mitokondrium által felhasznált oxigén 1-5%-a) ROF-á alakul át a sejt életfolyamatai során (Møller, 2001; Møller és mtsai, 2007). Az elsődleges ROF források a kloroplasztisban és a mitokondriumban lezajló elektrontranszfer-reakciók, valamint a peroxiszómában történő oxidatív reakciók.

A réz, mint redox aktív nehézfém a már korábban bemutatott Fenton és Haber-Weiss reakciókon keresztül képes katalizálni a ROF képződését. Ezzel szemben a cink mint nem redox aktív nehézfém alapvetően a kulcsfontosságú funkcionális csoportok blokkolása révén képes oxidatív stressz kiváltására. Nagy affinitással kötődik oxigén-, nitrogén- és kénatomokhoz, így az enzimeket a cisztein aminosavaikhoz kötődve képes inaktiválni (Nieboer és Richardson, 1980); emellett képes más, esszenciális fémionok helyettesítésére is az enzimek katalitikus helyein (Schützendübel és Polle, 2002). Más, nem redox aktív és nem esszenciális nehézfémek, mint például a kadmium, képesek indukálni a peroxiszóma-képződést (Lopez-Huertas és mtsai, 2000; Igamberdiev és Lea, 2002), emellett a plazmamembrán-kötött NADPH-oxidáz is szerepet játszik a nehézfém-indukált ROF képződésben, például kadmiumkezelt borsó (Rodríguez-Serrano és mtsai, 2006) vagy ólomkezelt *Vicia faba* növényekben (Pourrut és mtsai, 2008). A NADPH-oxidáz aktivációjában a nehézfémek kalcium- és protein kináz-függő útvonalakon keresztül vesznek részt (Rodríguez-Serrano és mtsai, 2006; Pourrut és mtsai, 2008; Garnier és mtsai, 2006; Yeh és mtsai, 2007). A NADPH-oxidáz aktivitása emellett Cd^{2+} - de nem Cu^{2+} -indukált MAPK aktivációval is kapcsolatban áll rizs gyökerében. A kadmium-indukált MAPK aktiváció emelheti a Cd-toleranciát a rizsben, mivel a kadmiumtoleráns fajták jelentősen magasabb MAPK aktivitással rendelkeznek (Yeh és mtsai, 2007).

A ROF képződése gyors folyamat, ezt számos kutatás bizonyította: *Pinus sylvestris* magoncokban például az 50 μM kadmiumkezelés már hat óra alatt emelkedést okozott a mennyiségükben (Schützendübel és mtsai, 2001). Rézkezelt búza gyökereiben gyors szuperoxid gyökanion akkumuláció történt a megemelkedett szuperoxid dizmutáz aktivitással párhuzamosan a kezeléstől eltelt első és hatodik óra között (Sgherri és mtsai, 2007); illetve a kadmiumkezelt *Nicotiana tabacum* sejtek halálát megelőzte a NADPH-oxidáz-függő hidrogén-peroxid akkumuláció és az azt követő szuperoxid gyökanion és zsírsav-hidroperoxid felhalmozódás (Garnier és mtsai, 2006). A korábbi kutatások alapján a sejt redox állapotának megváltozása elengedhetetlen előfeltételének tűnik a nehézfém-függő fitotoxicitási tünetek kialakulásának (Sharma és Dietz, 2008).

II.5.2. A ROF és a biomolekulák reakciója

A Fenton és Haber-Weiss reakció során képződő hidrogén peroxid nem-specifikus lipidperoxidációt okoz (Dietz és mtsai, 1999), aminek tipikus terméke a malondialdehid, aminek ha az aránya növekszik a membránban, megváltoznak olyan alapvető tulajdonságai, mint a fluiditása és iontranszport-képességei, emellett inaktiválódhatnak enzimek, valamint zavar támadhat a fehérjék kölcsönhatásaiban is. Az előbbieken említett folyamatok végső esetben sejthalálhoz vezethetnek (Sharma és mtsai, 2012). A membrán foszfolipidek többszörösen telítetlen zsírsavláncai a ROF káros hatásának elsődleges célpontjai. A lipidperoxidáció folyamata alapvetően három szakaszra bontható (iniciáció, propagáció, termináció), ezek közül az első, iniciációs szakaszban történik meg a többszörösen telített zsírsavláncok és a hidroxilgyök vagy a szuperoxid gyökanion reakciója révén a zsírsav-gyök keletkezése, ami később egy öngerjesztő láncreakciót indít el (Smirnoff, 1995). Az oxidált, többszörösen telített zsírsavak olyan jelmolekulák prekursorai, mint a jázmonsav, oxilipinek és ezek volatilis származékai (Matsui, 2006; Wasternack, 2007).

II.5.3. A ROF eliminációjának lehetőségei növényekben

A ROF szintjét a növényekben az antioxidáns rendszerek szabályozzák. Ezeket a védelmi rendszereket különböző metabolitok alkotják, mint az aszkorbát, glutation vagy a tokoferol, emellett enzimatikus komponensek is részt vesznek a reaktív oxigénformák semlegesítésében, például a szuperoxid-dizmutázok, peroxidázok vagy a katalázok (Noctor és Foyer, 1998; Asada 1999).

II.5.3.1. Sejtszintű antioxidáns védelem és annak státusza nehézfém stressz alatt - antioxidáns enzimek

Az antioxidáns védelmi mechanizmusok tartják alacsonyan a sejtben a normális működés során is képződő ROF szintjét, megelőzik, hogy toxikus mennyiségben halmozódjanak fel (Mittler és mtsai, 2004). A különböző abiotikus stresszorok felborítják az egyensúlyt a ROF képződése és semlegesítődése között (Møller és mtsai, 2007). Az enzimatikus antioxidáns védelmi rendszer számos komponensből áll: a szuperoxid gyökanion semlegesítése a

szuperoxid dizmutáz (SOD), és a hidrogén-peroxid lebontása az aszkorbát peroxidáz (APX), peroxiredoxinok (PRX) és kataláz (KAT) által elsősorban a sejt redoxállapotának fenntartásával függ össze. A SOD, APX és PRX különböző izoformái számos sejtkompartimentumban megtalálhatók, míg a kataláz elsősorban a peroxiszómában lokalizálódik. A fent említett enzimek erősen eltérnek szubsztrát-affinitásukban és szigorúan szabályozzák - alacsony szinten tartják - a hidrogén-peroxid koncentrációját (Mittler, 2002). Más enzimek, mint a glutation peroxidáz és a glutation-S-transzferáz szintén a sejt redox-egyensúlyának fenntartásában vesznek részt. Az antioxidáns enzimek aktivitása eltérően reagálhat a nehézfémstresszre, aktivitásuk nőhet vagy csökkenhet, valamint változatlan is maradhat, ez függ a növényfajtól, az alkalmazott fémtől, annak koncentrációjától és a kitettség időtartamától (Schützendübel és Polle, 2002).

Az enzimatisz antioxidánsok mellett a sejt redoxállapotának fenntartásában kulcsfontosságú szerepet játszanak a nem-enzimatisz antioxidánsok is. Ezeket a védelmi rendszereket különböző metabolitok alkotják, mint az aszkorbát, glutation vagy a tokoferol (Noctor és Foyer, 1998; Asada 1999). Az aszkorbát redukált állapotában tartásáért a monodehidroaszkorbát-reduktáz enzim a felelős, NAD(P)H vagy ferredoxin, mint reduktáns felhasználásával vagy az aszkorbát-glutation rendszer közreműködésével (Foyer és Halliwell, 1976). Az utóbbi esetben a dehidroaszkorbát redukciója a glutation (GSH) párhuzamos oxidációjához kapcsolódik, amit pedig a glutation-reduktáz alakít vissza NADPH oxidációja mellett (Foyer és Halliwell, 1976).

II.5.3.2. A nehézfém-tolerancia és az antioxidáns védekező rendszer kapcsolata

Jelenlegi tudásunk szerint három fő mintázat fedezhető fel a különböző fajok vagy ökotípusok nehézfémstresszre adott válaszaiban. Egyrészt a nagyfokú nehézfém-érzékenység gyakran kapcsolt az alacsony szintű konstitutív antioxidáns védekező rendszer aktivitással. Másrészt nehézfém toleráns és hiperakkumuláló fajok magasabb fokú antioxidáns kapacitásának gyakori eleme olyan hidrogén-peroxid lebontó enzimek állandó magas aktivitása, mint a KAT vagy az APX, ami alapján feltételezhető, hogy a hidrogén-peroxid egyfajta mediátor szerepet tölthet be a nehézfém toxicitásban. Ezt a hipotézist támasztja alá a hidrogén-peroxid relatív hosszú féléletideje (1 ms) (Møller és mtsai, 2007), ami lehetővé teszi, hogy a sejtek között

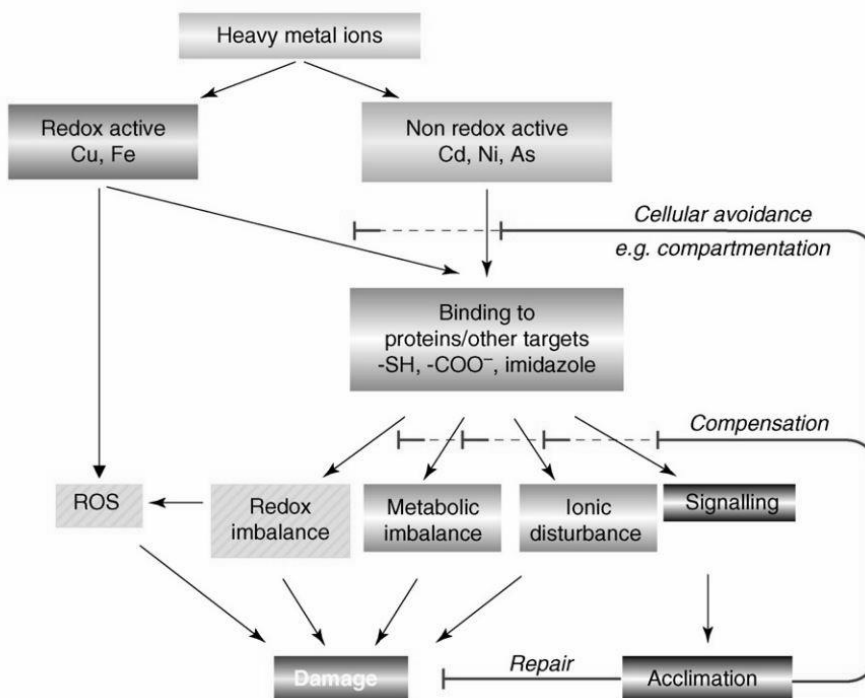
diffundáljon, amit a transzmembrán akvaporin csatornák segítenek (Bienert és mtsai, 2007). Harmadrészt a nehézfém-toleráns hiperakkumuláló növényekben tapasztalt magasabb szuperoxid dizmutáz aktivitás a szuperoxid gyökanyon bontásával segít csökkenteni az abból származó károsodásokat (Sharma és Dietz, 2008).

Az antioxidáns védelmi rendszer fent említett komponensei mellett más molekulák is részt vesznek a nehézfémstresszre adott válaszreakcióban. A peroxiredoxinok erős, tiol alapú peroxid-reduktázok, számos organelum-specifikus, többek között mitokondrium- és kloroplasztisz-lokalizált variánssal. Ezen általánosan elterjedt enzimek széles specifitással rendelkeznek, védik a DNS-t az oxidatív károsodásoktól, emellett szabályozzák a ROF- és RNF-hoz kapcsolt intracelluláris jelátviteli folyamatokat is (Dietz és mtsai, 2006). Különböző poliaminok, valamint a prolin alapvetően ozmoregulátorként, gyökfogóként, elektron-elnyelőként, makromolekula-stabilizálóként, illetve sejtfalkomponensként ismertek (Matysik és mtsai, 2002), de mint jelátviteli molekulák vagy antioxidánsok is részt vesznek a nehézfém-indukált jelátviteli válaszokban (Sharma és Dietz, 2006). A növényekben tokoferolok és tokotrienolok is szintetizálódnak, ezek hatékonyan reagálnak a szinglet oxigénnel, emellett terminátorként működnek a lipid peroxidációs láncreakciókban is (Maeda és DellaPenna, 2007). A szén-monoxid állatokban bioaktív jelátviteli molekula szerepét tölti be, emellett számos stressz hatására megemelkedik a hemoxidáz-függő termelődése (Muramoto és mtsai, 2002; Piantadosi, 2002).

II.5.4. Nehézfém-indukált jelátvitel

A nehézfémek megzavarják a sejten belüli jelátviteli útvonalakat, sőt feltételezhető, hogy a nehézfémek által okozott változások a jelátviteli eseményekben jelentős részben felelősek a nehézfémekre adott toxicitási válasz, valamint a károsodás kialakításában is (Sharma és Dietz, 2008) (3. ábra). A növényekben ezt meggyőző bizonyítékok szemléltetik a réz és a cink mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli kaszkáddal való interferencián keresztül. A réztöbblet gyorsan indukál MAP kinázokat (SIMK, MMK2, MMK3 és SAMK) *Medicago sativa* növényben, azonban ugyanezen kinázok csak jelentős időbeli késéssel aktiválódnak kadmium hatására (Jonak és mtsai, 2004). Az eltérés a jelátviteli válaszban feltehetően a két nehézfém eltérő redox-kapacitásával áll összefüggésben, mivel a réz redox aktív, míg a kadmium csupán indirekt módon képes reaktív oxigénformák generálására. A cink, a kadmiumhoz hasonlóan szintén képes a MAPK útvonal aktiválására, ennek hátterében szintén

a ROF mennyiségének megemelkedésével hozható összefüggésbe (Lin és mtsai, 2005). A MAPK útvonalak változatos jelátviteli ingereket integrálnak, bizonyos elemeit a ROF is aktiválhatja (Zhang és Klessig, 2001). Különböző gátlószerek használatával közvetett bizonyítékokat találtak rizs növényben arra, hogy a NADPH-oxidáznak és a működőképes mitokondriumoknak is szerepe van a rizs MAPK útvonal aktiválódásában (Yeh és mtsai, 2007), hasonlóan a szintén rizsben tapasztalt ólom-indukált sejthalálhoz (Huang és Huang, 2008). Növényi hormonok, mint a jázmonsav, szalicilsav és etilén szintje megemelkedik nehézfém stressz hatására (Rodríguez-Serrano és mtsai, 2006; Metwally és mtsai, 2003; Maksymiec és mtsai, 2005), azonban ezen hormonok szerepe a nehézfém toleranciában vitatott, mind pozitív (kadmium és mangán toxicitásának enyhítése az antioxidáns enzimek aktiválásán keresztül (Metwally és mtsai, 2003; Shi és Zhu, 2008)) mind negatív hatásokat (hidrogén-peroxid termelés növelése (Zawoznik és mtsai, 2007)) is leírtak.



3. ábra: A nehézfém-indukált károsodás kialakulása az arra érzékeny növényekben (Sharma és Dietz, 2008). A redox-aktív fémek közvetlenül képesek ROF képzésére. A nem redox-aktív nehézfémek esetén általános reakció a célfehérjékhez történő kötődés vagy a kötőhelyekért versengés, így a funkció megváltoztatása, ami megzavarja a sejt metabolizmusát, ami vagy akklimatizációhoz, vagy károsodáshoz vezet. SH: tiolok, COO⁻: karboxilsav.

II.5.4.1. A ROF szerepe a jelátvitelben

Hosszú ideig a ROF csak mint káros molekulák szerepeltek a köztudatban, amik szintjét a lehető legalacsonyabban kell tartani (Schützendübel és Polle, 2002). Ez a vélekedés jelentősen megváltozott az elmúlt években, hiszen fény derült a ROF szerepére a növények patogénekkal szembeni védelmi rendszerében (oxidatív robbanás, Alvarez és Lamb, 1997; Doke, 1997; Bolwell és mtsai, 2002); a különböző fejlődési stádiumokban, a lignifikációban és egyéb keresztkötéseket érintő folyamatokban a sejtfalban, emellett jelátviteli molekulaként a génkifejeződés szabályozásában (May és mtsai, 1998; Karpinski és mtsai, 1999; Neill és mtsai, 2002; Vranová és mtsai, 2002). A ROF ezen sokrétű funkciója miatt azok sejten belüli szintje szoros kontroll alatt kell legyen, viszont eközben nem eliminálódhatnak teljesen (Schützendübel és Polle, 2002).

A hidrogén-peroxid központi szerepet játszik a nehézfém-indukált stresszválaszokban. Lin és mtsai (2005) szerint a réz a hidrogénperoxid-függő peroxidáz aktivitáson keresztül fejti ki hatását, a sejtfal rigiditását növelve a sejtfalat alkotó polimerek közti keresztkötések számának növelésével. A hidrogén-peroxid valószínűleg a megnövekedett NADPH-oxidáz aktivitás eredménye (Foreman és mtsai, 2003), a sejtfal rigiditásának növelése mellett megváltoztatja a sejtek redox-állapotát, mintegy figyelmezteti a sejtet a környezeti stresszre (Foyer és Noctor, 2003), miközben növelheti a növény antioxidáns válaszát a kalcium jelátviteli úton keresztül a glutation transzferáz gén átírásának fokozása révén (Rentel és Knight, 2004). Bár a réz hidrogén-peroxid képződést indukáló hatása ismert *Arabidopsis*-ban és paradicsomban (Romero-Puertas és mtsai, 2004; Maksymiec és Krupa, 2006), más fémek más növényekben eltérő módon indukálják a hidrogén-peroxid termelődését, ennek mechanizmusa jelenleg még nem teljesen ismert. Sok fém elsődleges hatása a NADPH-oxidáz aktiválása, részben a szuperoxid gyökanyon mennyiségének emelkedésével párhuzamosan (Romero-Puertas és mtsai, 2004), valamint az aktiválódott jázmonsav jelátvitel és a megnövekedett SOD aktivitás is gyakran megfigyelhető (Maksymiec és Krupa, 2006). A direkt és indirekt hatások mellett a másodlagos anyagcseretermékek szintézise is megemelkedik (Rakwal et al 1996, Pitta-Alvarez et al 2000, Schützendübel és Polle 2002), emellett a patogenezishez kapcsolt fehérjék, valamint a megnövekedett energiafelhasználás miatt csökkenhet az alapvető metabolitok mennyisége és a növény produktivitása. A növény ellenálló képességét a fejlődési stádium, a növényfaj és a nehézfém kitettség időtartama is befolyásolja (Maksymiec, 2007).

II.6. A RNF és a nitrozatív stressz

A RNF keletkezése és hatása egy újabban egyre nagyobb figyelmet kapó terület, az elmúlt évtizedben hatásaik mind állatokban mind növényekben egyre kutatottabbak. A reaktív nitrogénforma gyűjtőfogalom a ROF-éhoz hasonlóan több molekulát takar: alapvető tagja a nitrogén-monoxid (NO), emellett ide sorolható még a peroxinitrit, az S-nitrozoglutation, a dinitrogén-trioxid és a dinitrogén-tetraoxid (Molassiotis és Fotopoulos, 2011).

Az oxidatív stressz koncepció analógiájára a nitrozatív stressz, mint fogalom is egyre elterjedtebb az irodalomban, ami a NO és származékainak szabályozatlan vagy szabályozott túltermelését és ezek toxikus következményeit jelenti (Klatt és Lamas, 2000). A toxikus következmények között meg kell említeni a DNS, lipidek, fehérjék és szénhidrátok károsodását, amik végső soron károsítják a sejtfunkciókat (Corpas és mtsai, 2006).

A RNF képződése minden esetben a NO-ból indul, így elengedhetetlen képződésének és hatásainak részletesebb bemutatása.

II.6.1. A NO tulajdonságai

A NO számos életfolyamatban betöltött szerepe miatt az élettani kutatások egyik kulcsfontosságú molekulája. Ez olyannyira igaz, hogy 1992-ben a Science tudományos folyóirat az év molekulájának nevezte, valamint a vele kapcsolatos élettani kutatásaik elismeréseként Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro és Ferid Murad Nobel-díjat kapott.

Annak ellenére, hogy a NO egy meglehetősen egyszerű molekula, kémiaiailag igencsak változatos tulajdonságokkal és reakciókkal rendelkezik. Atmoszférikus nyomáson a NO egy lipofil tulajdonságokkal bíró gáznemű szabad gyök, kis Stokes-sugara és semleges töltése miatt gyorsan képes átdiffundálni a membránokon (Goretski és Hollocher, 1988; Stamler és mtsai, 1992), diffúziós sebessége akár 50 μm is lehet másodpercenként (Corpas és mtsai, 2007).

Alapállapotban a NO párosítatlan elektronnal rendelkezik a π pályáján (Stamler és mtsai, 1992), ennek az elektronnak az eltávolításával nitrozónium kation (NO^+), míg egy elektron hozzáadásával nitroxil anion (NO^-) keletkezik. A NO szabadgyök tulajdonságokkal is bír,

viszont a többi szabad gyökkel szemben féléletideje viszonylag hosszú, ami azonban erősen függ saját, valamint célmolekuláinak koncentrációjától is. Ha magas koncentrációban van jelen (magasabb, mint 1 $\mu\text{mol/l}$) akkor féléletideje csupán pár másodperc, ennél alacsonyabb koncentrációban azonban akár az órák nagyságrendet is elérheti (Stöhr és Ullrich, 2002).

II.6.1.1. A NO képződése

Növényekben a NO szintézise jóval összetettebb folyamat, mint amit az állatokban leírtak (ahol a NO szintáz enzim deaminált L-argininből NO-t és L-citrullint képez oxigén és NADPH jelenlétében (Nappi és mtsai, 2000)), mivel a NO képzésében számos enzimatis és nem enzimatis reakcióút is szerepet kap (Saldago és mtsai, 2013).

Mostani tudásunk szerint hét különböző útvonalon képződhet NO a növényi szervezetben, amik között elkülöníthetünk oxidatív és redukzív útvonalakat (Gupta és mtsai, 2011). Az oxidatív útvonalakhoz megfelelő mennyiségű oxigén szükséges, míg a redukzív útvonalak csökkent oxigénszint mellett jutnak nagy szerephez.

A redukzív enzimatis útvonalak közös tulajdonsága, hogy a NO nitritből képződik, ezt a folyamatot azonban számos enzim katalizálhatja. Ilyen enzim a plazmamembrán kötött nitrát redukáz valamint a gyökérspecifikus membrán-lokalizált nitrit:NO redukáz (Stöhr és mtsai, 2001), aminek további fontos feladata a talajban található nitrát érzékelése. A citoszolikus nitrát redukáz szintén gyorsan aktiválódó, fontos forrása a NO-nak (Xu és Zhao, 2003), aminek működéséhez megfelelő mennyiségű oxigén szükséges. Ez az enzim nagy affinitással katalizálja a nitrát NADP(H)-függő reakcióját nitritté, majd a nitrit tovább redukálódhat ammóniává a nitrit redukáz enzim segítségével. Emellett a nitrát redukáz képes a nitritet NO-dá alakítani (Xu és Zhao, 2003), ez azonban csak akkor megy végbe, ha a nitrát nagyobb mennyiségben van jelen, mint a nitrit (Bellin és mtsai, 2013). A növényi rendszerekben előfordul a NO nem enzimatis útvonalakon történő képződése is, például a savas pH-n történő spontán nitrit redukció, a nitrit bontása redukált aszkorbát által, és a NO₂ fény által szabályozott redukciója karotinoidok katalizációjával (Wojtaszek, 2000).

Nitritből szintén képződhet NO anoxiás körülmények között a mitokondriális elektrontranszport-láncon keresztül is, a mitokondrium belső membránjában; ez oxigénhiányos körülmények között jelentős mennyiségű NO-t eredményezhet. A peroxisómában lokalizált xantin oxidoreduktáz szintén kimondottan oxigénmentes

körülmények között képes nitritből NO-t képezni, NADH felhasználása mellett (Mur és mtsai, 2012).

Az oxidatív enzimatis folyamatok közül talán a legfontosabb az L-arginin-függő NO szintáz (NOS) aktivitás. Az állati sejtekben bizonyítottan létező enzimnek a növényi rendszerekben mindeddig csak az aktivitását tudták kimutatni, az enzimet kódoló gént nem találták meg a növényi genomban (Chaki és mtsai, 2011). Az enzim hasonlóan az állati NOS-hoz L-arginin szubsztátot és kalmodulint, tetrahidrobiopterint (BH₄), valamint FAD, FMN és NADPH kofaktort használ (Corpas és mtsai, 2009). Újabb tanulmányok azonosítottak két, NOS-szerű enzimet *Ostreococcus tauri* algában (Foresi és mtsai, 2010), de továbbra is kérdéses a NOS enzimek létezése a magasabbrendű növényekben. Poliaminok, mint a spermin és spermidin szintén NO képződést okoznak, és bár ennek pontos mechanizmusa egyelőre ismeretlen, a hatás gyors megjelenése alapján közvetlen kapcsolat feltételezhető köztük (Gupta és mtsai, 2011).

Optimális esetben a növényekben található NO mennyisége jól szabályozott egyensúlyban van, azonban bizonyos körülmények hatására káros koncentrációban is felhalmozódhat, így szükségessé válhat eltávolítása. A nagy mennyiségű NO pro-oxidáns tulajdonságai mellett amiatt is káros lehet, hogy jelátviteli funkcióit csak alacsony koncentrációban képes ellátni, emiatt a növényekben több eltávolítási mechanizmus alakult ki mennyiségének csökkentésére. Legkézenfekvőbb az oxigénnel lejátszódó reakciója, ami nitritet és nitrátot eredményez, de szintén általánosan reagál ROK-kal, például szuperoxid gyökanionnal, peroxinitritet képezve. Ezen kívül amellet, hogy olyan egyszerű vegyület, mint a húgysav is képes megakadályozni a NO toxicitást (Alamillo és Garcia-Olmedo, 2001), más, jóval szelektívebb enzimatis szabályozás is kialakult. Ilyen például a GSNO reduktázhoz köthető folyamat (Malik és mtsai, 2011), ahol az enzim által katalizált reakcióban a NO és a GSH kölcsönhatása révén keletkező GSNO oxidált glutationná és ammóniává alakul (Wilson és mtsai, 2008), így csökkentve egyrészt az endogén NO másrészt az azt raktározó GSNO szintjét.

II.6.1.2. A NO antioxidáns és pro-oxidáns tulajdonságai

A NO-nak, mint endogén szabadgyöknek felfedezése óta kettős szerepet tulajdonítanak, ami lehet citotoxikus vagy a sejtet védő is (Beligni és Lamattina, 1999; Stamler 1994). A NO

sejtvédő funkciója egyelőre jobban ismert terület, protektív szerepe a ROF mennyiségének és toxicitásának szabályozásából ered (Halliwell és Gutteridge, 1984). A NO komplex redox-kémiai reakcióiból adódóan képesnek tűnik a redox homeosztázis általános szabályozására (Stamler és mtsai, 1992), képes lehet védő szerepben feltűnni a megnövekedett szuperoxid gyökanyon, hidrogén-peroxid és alkil-peroxidok által kiváltott oxidatív stresszel szemben (Wink és mtsai, 1995). Mindezek mellett a NO molekula maga is rendelkezik antioxidáns tulajdonságokkal (Kanner és mtsai, 1991). A Fenton reakció során kialakuló oxidatív stresszt a NO képes enyhíteni a redox-aktív nehézfém vagy a köztitermék szuperoxid gyökanyon semlegesítésével, így limitálva a hidroxilgyök képződését (Beligni és Lamattina, 2001, 2002; Wink és mtsai, 1995). Számos kutatás bizonyítja, hogy a NO képes megtörni a lipidperoxidáció terjedését okozó láncreakciókat is (Hogg és mtsai, 1993; Rubbo és mtsai, 1994).

A NO-kapcsolt toxicitás elsősorban a szuperoxid gyökannyal való reakció során képződő peroxinitrittel kapcsolatos, ami erős oxidánsként képes a szulfenil és a szulfonilsav tiolcsoportjainak oxidálására (Huie és Padmaja, 1993), vagy a fehérjék tirozin oldalláncainak nitrálására (Reiter és mtsai, 2000). Az utóbbi gátolhatja a fehérjék foszforilációját, azonban a peroxinitrit-kapcsolt tirozin nitráció funkcionális következményeinek vizsgálata jelenleg is egy intenzíven kutatott, jobbra ismeretlen terület (Corpas és mtsai, 2013).

II.6.2. A NO jelátvittele növényekben

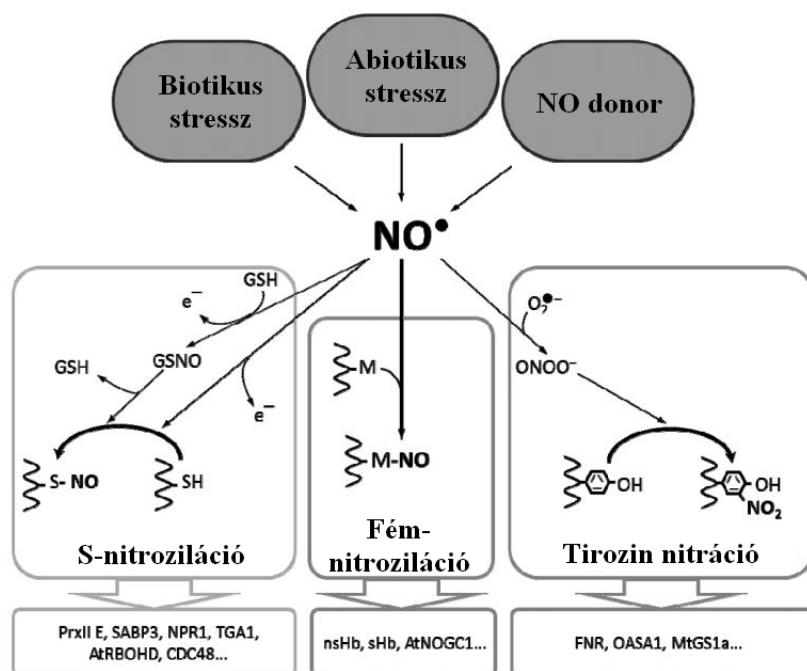
A NO sejten belüli koncentrációjának függvényében kettős hatással bír: nagy mennyiségben sejtkárosodást okoz, alacsony mennyiségben azonban jelátviteli molekulaként számos fiziológiai folyamat résztvevője. A RNF felszaporodása károsíthatja a DNS-t, fehérjéket és lipideket, ami hosszabb távon sejthalálhoz vezethet (Corpas és mtsai, 2007), azonban a NO és peroxinitrit saját jelátviteli hálózattal rendelkezik.

A NO jelátvitelének egyik fő mechanizmusa a ciklikus guanozil monofoszfát (cGMP)-függő útvonal. A NO a cGMP útvonalba a szolubilis guanilát cikláz (sGC) hem vasán keresztül kapcsolódik be, konformációs és aktivitásbeli változásokat okoz (Martí és mtsai, 2005). Ha a GC aktivitás ennek következtében fokozódik, a megnövekedett cGMP mennyisége többek között cGMP-függő protein kinázokat aktivál. A cGMP jelátvitelben betöltött szerepét számos növényi életfolyamatban bizonyították, például a járulékos gyökérfejlődésben, a pollentömlő

növekedésében vagy épp az abszcizinsav-indukált NO és cGMP által szabályozott sztómazáródásban (Prado és mtsai, 2004; Pagnussat és mtsai, 2003; Neill és mtsai, 2008).

A cGMP-függő útvonal mellett számos esetben kimutatták a NO és a Ca^{2+} közötti jelátviteli kapcsolat meglétét növényekben. A NO felszabadulása több esetben Ca^{2+} -függő, miközben a NO is képes szabályozni a Ca^{2+} sejten belüli raktárakból való felszabadulását, emellett a sejtbe irányuló felvételét is. A NO emellett hatással van a Ca^{2+} jelátvitelében szereplő gének expressziójára is (Jeandroz és mtsai, 2013).

A NO jelátvitelére ezek mellett megvalósulhat a MAPK kaszkád keresztül is. Ennek elemei számos folyamatban, így az abiotikus és biotikus stresszfolyamatokban, a sejtciklus szabályozásában és az egyedfejlődésben is szerepet játszanak. Például az uborka oldalgyökerfejlődése során a NO kezelés MAPK kaszkád aktivációt okozott (Pagnussat és mtsai, 2004).



4. ábra: A nitrogén-monoxid- függő poszttranszlációs módosítások sematikus vázlata (Astier és Lindermayr, 2012). A bitoikus vagy abiotikus stresszoroknak köszönhetően képződő vagy külsőleg hozzáadott NO S-nitrozilációt, fém nitrozilációt vagy tirozin nitrációt okozhat a fehérjéken.

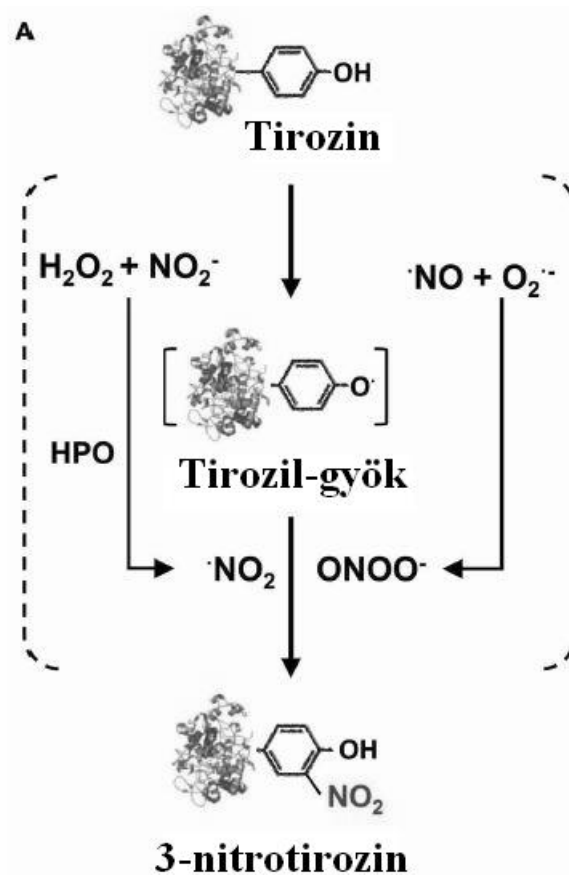
A közvetett hatások mellett a NO képes közvetlenül módosítani a célfehérjét poszttranszlációs módosításokon (PTM) keresztül, amik közül három fő NO-függő PTM

emelkedik ki: a NO és a metalloproteinek reakciója az úgynevezett fém-nitroziláció; a fehérjék tirozin oldalláncainak módosítása 3-nitrotirozinná; valamint a fehérjék cisztein oldalláncainak S-nitrozilációja (Astier és Lindermayr, 2012). (4. ábra) A fém nitroziláció során a NO olyan fehérjékkel lép kölcsönhatásba, amik valamilyen átmeneti fémet (pl. Cu, Zn, Fe) tartalmaznak; a visszafordítható reakció során fém-nitrozil komplexek képződnek (Astier és Lindermayr, 2012). Az S-nitroziláció során a NO reverzibilisen kötődik a fehérje ciszteinjén található tiolsoporthoz, S-nitrozotiol kialakítva; a folyamat jelentőségét számos esetben leírták (Freschi 2013; Astier és Lindermayr, 2012). Bizonyos körülmények között más NO-függő módosítások is történhetnek, mint az S-glutationiláció vagy diszulfid-hidak képződése (Giustarini és mtsai, 2005; Gopalakrishna és mtsai, 1993; Tada és mtsai, 2008).

II.6.2.1. Tirozin nitráció növényekben

A tirozin nitráció egy nitráló ágens reakcióját jelenti a célfehérje tirozin aminosavával, ami egy nitro-csoport (NO₂) hozzáadását eredményezi az orto helyzetben lévő szénatomhoz, 3-nitrotirozint képezve (Schopfer és mtsai, 2003). (5. ábra) A nitro-csoport főként a peroxinitritből származik, ami egy, a NO és szuperoxid gyökanion reakciójából képződő, erős oxidatív tulajdonságokkal rendelkező molekula. Fiziológias körülmények között a peroxinitrit reagálhat szén-dioxiddal, és lebomolhat karbonát gyökanionná valamint nitrogén-dioxiddá, ami egy erőteljes nitráló ágens. Emellett a tirozin nitráció lehet a NO és a tirozil-gyök reakciójának eredménye is (Gunther és mtsai, 2002).

A tirozin nitráció csupán a célfehérje bizonyos tirozin aminosavain történik meg (Ischiropoulos, 2003; Bayden és mtsai, 2011), konformációs változások kialakulásához vezethet, ami okozhatja egyrészt a célprotein aktiválódását vagy annak gátlását is. Emellett a protein funkcióját megváltoztathatja annak révén is, hogy a nitro-csoport beékelődése az aromás gyűrűbe lecsökkenti a fenolos csoport disszociációs állandóját (tirozin: 10,1; nitrotirozin 7,2), ami mind térbeli, mind töltésbeli változást okoz, befolyásolva a tirozin funkciójának betöltését elektrontranszfer-reakciókban és a fehérje térszerkezetének fenntartásában (Corpas és mtsai, 2013).



5. ábra: A fehérje tirozin nitráció biokémiája. A tirozin nitráció két lépésből áll: a tirozin fenolgyűrűjének oxidációja tirozil-gyökké, és a NO_2 csoport hozzáadódása egy nitráló ágens által. A tirozil-gyök létrejöttét számos szabad gyök katalizálhatja, úgy mint a $\cdot NO_2$, $\cdot OH$, vagy $CO_3^{\cdot -}$. Két fő nitrációs reakcióút ismert, az egyik a NO és szuperoxid gyökanion ($O_2^{\cdot -}$) reakciójából keletkező peroxinitriten ($ONOO^-$) keresztül, a másik hemoperoxidáz (HPO) jelenlétében hidrogén-peroxidból (H_2O_2) és nitritből (NO_2^-) képződő $\cdot NO_2$ általi. (Corpas és mtsai, 2013)

Habár ezt a módosulást eleinte visszafordíthatatlannak gondolták, egyre több bizonyíték utal arra, hogy léteznek mind enzimatis, mind nem-enzimatis denitrációs folyamatok is (Abello és mtsai, 2009; Vandelle és Delledonne, 2011). A folyamat visszafordíthatóságát bizonyítja az a tény, hogy a patogéntámadásnak kitett *Arabidopsis thaliana* növényben a fehérje tirozin nitráció megnövekedése csak átmeneti jelenség (Cecconi és mtsai, 2009; Romero-Puertas és mtsai, 2007). Fontos megjegyezni, hogy bár állatokban a protein tirozin nitráció a fehérje lebomlásával jár együtt (Abello és mtsai, 2009), növényekben ilyen kapcsolatot egyelőre nem tártak fel.

A fehérjék nitrációja egészséges, kontroll növényekben is kimutatható (Corpas és mtsai, 2013), de emellett különböző biotikus és abiotikus stressznek kitett növényekben is jelen van

(Corpas és mtsai, 2008; Tanou és mtsai, 2012; Valderrama és mtsai, 2007; Signorelli és mtsai, 2013). Miközben a tirozin nitráció megléte számos esetben kimutatott, biológiai jelentősége nem igazán ismert a növényekben. Valószínű, hogy zavarja a foszforiláció/defoszforiláció alapuló jelátvitelt, különösen, ha mindkét módosítás ugyanazt a tirozin aminosavat érinti (Astier és Lindermayr, 2012).

A tirozin nitráció célfehérjéinek azonosítására egyelőre viszonylag kevés kísérlet történt, azonban ezek alapján számos életfolyamatban résztvevő fehérje részese lehet ennek a reakciónak. Lozano-Juste (2011) 127 valószínűsíthetően nitrálódó fehérjét azonosított *Arabidopsis thaliana*-ban, ami homológjainak 35%-a már más organizmusban is felmerült, mint nitrálódó fehérje. Ebben a kutatásban a fehérjék 60%-a az elsődleges metabolizmusban vesz részt.

II.6.3. A RNF és a nehézfémek kapcsolata

A nehézfémek és a RNF metabolizmusának kapcsolatáról kevés információ áll rendelkezésünkre, az eddigi eredmények pedig főleg a nem esszenciális kadmium hatásait tárgyalják, habár található pár hivatkozás a réz és cink vonatkozásában is.

Borsó és mustár gyökerekben a 100 μ M réz, cink és kadmium eltérő sebességű növekedést okozott a NO produkciójában: a Cu gyors NO felhalmozódást indukált, míg a Cd és Zn hatása lassú és fokozatos emelkedést tapasztaltak a NO szintjében (Bartha és mtsai, 2005). Más kutatások szerint az 50 μ M kadmiumkezelés jelentősen csökkentette a levélben és a gyökérben mérhető NO mennyiségét szintén borsó növényben (Rodríguez-Serrano és mtsai, 2006; Barroso és mtsai, 2006), amivel párhuzamosan a GSH, GSNO és GSNOR transzkript szintje is csökkent (Barroso és mtsai, 2006). Fehér nyár sejt kultúrában a réz- és kadmiumkezelés duplájára illetve háromszorosára növelte a termelődő NO mennyiségét, miközben a cinkkezelésnek kitett sejtek NO produkciója nem változott (Balestrazzi és mtsai, 2009).

II.6.3.1. A NO szerepe a nehézfém stressz hatásainak kivédésében

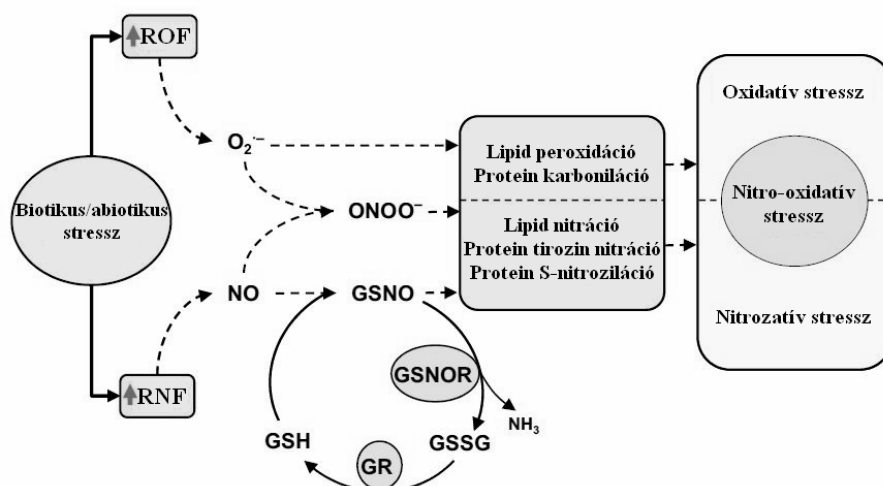
Miközben az endogén NO szerepe a nehézfémstresszre adott válaszban nem ismert részleteiben (Corpas és mtsai, 2006), az eddigi eredmények alapján az exogén NO fontos szerepet tölt be a mikroelemek felvételében és a nehézfémek toxikus hatásainak kivédésében.

Számos kutatás bizonyítja, hogy a hozzáadott NO-nak fontos szerepe van a nehézfémek káros hatásainak kivédésében, ezzel kapcsolatban három fő mechanizmus ismert (Xiong és mtsai, 2010). Elsőként, a sejtfalat alkotó komponensek befolyásolásával a NO képes lehet a sejtfalban történő nehézfém-akkumuláció emelésére és ezáltal az oldott frakció nehézfémtartalmának csökkentésére a levelekben (Xiong és mtsai, 2009). A legtöbb, sejtfal-kötött nehézfém a poligalakturonsavhoz kapcsolódik, ezen kapcsolat affinitása változó a nehézfém tulajdonságaitól függően (Ernst és mtsai, 1992); a növényi sejtfal két fő alkotója, a pektinek és a hemicellulózok poligalakturonsavban gazdag molekulák (Cosgrove, 2005). Az irodalomban leírták, hogy a cellulóz mennyiségét a paradicsom gyökér sejtfalaiban a NO koncentrációfüggő módon befolyásolja (Correa-Aragunde és mtsai, 2008; Taylor, 2008), emellett a xilémsejtek differenciációja során NO robbanást tapasztaltak (Gabaldón és mtsai, 2005), valamint burgonyalevelek NO-dal történt kezelése növelte a kallóz szintézisét és akkumulációját (París és mtsai, 2007). Másodrészt lehetséges a nehézfémek hatásainak enyhítése a NO jelmolekulaként betöltött szerepének kihasználásával a nehézfémstressz okozta génexpresszió-változásban. A rendszerhez adott NO a gének expresszióját a célfehérjék S-nitrozilációján, a protein kináz aktivitásán, a Ca^{2+} mobilizációján és más másodlagos hírvivők, mint a cGMP és cADPR keresztül szabályozza (Besson-Bard és mtsai, 2009). Az exogén NO hatása a nehézfémtoleranciával kapcsolatos génekre azonban egyelőre kevésbé ismert. Harmadrészt a NO képes indirekt módon semlegesíteni a nehézfém-indukált módon képződő ROF-at, valamint érintett lehet az antioxidáns-tartalom emelésében és az antioxidáns enzimek kapacitásának növelésében is (Hsu és Kao, 2004). Megjegyzendő azonban, hogy a ROF/NO interakciója lehet toxikus is a sejtre nézve, a relatív ROF/NO aránytól függően (Beligni és Lamattina, 1999).

II.7. A ROF és RNF kapcsolata – nitro-oxidatív stressz

A nitro-oxidatív stressz fogalma, egy újonnan felmerült koncepció (Corpas és Barroso, 2013), használata sok esetben praktikusabb a növényi stresszfiziológia komplex és egyre

intenzívebben kutatott területén, mint külön az oxidatív és nitroztatív stresszé. Nitroztatív stressznek - az oxidatív stressz fogalmának analógjaként - nevezzük a NO és származékainak káros hatásainak összességét. A ROF és RNF interakcióját jól példázza a szuperoxid gyökanion és a NO reakciójából képződő peroxinitrit, egy erős oxidáns, a nitroztatív stressz indikátorának, a már tárgyalt fehérje tirozin nitrációnak a kiváltója (Corpas és mtsai, 2007) (6. ábra). Szintén a két csoport kölcsönhatására példa a peroxiredoxin enzim, aminek a feladata a peroxinitrit semlegesítése, azonban ennek aktivitását az S-nitroziláció gátolja (Romero-Puertas és mtsai, 2007), aminek szintje szintén kapcsolatban van mind az oxidatív (glutathion mennyisége), mind a nitroztatív (NO) stresszel.



6. ábra: A nitro-oxidatív stressz a reaktív oxigén- és nitrogénformák közötti interakció biotikus vagy abiotikus stressz hatására bekövetkező sejtkárosodás során. A ROF és RNF szintjének emelkedése olyan makromolekula-károsodásokat okoz, amik az oxidatív és nitroztatív stressz markerének tekinthetők. (Corpas és Barroso, 2013)

Annak ellenére, hogy a ROF és RNF metabolizmusa között valószínűleg van kapcsolat fiziológiás valamint kedvezőtlen környezeti körülmények között is, meglepően kevés, a kapcsolat meglétének vizsgálatát középpontba helyező kutatás látott eddig napvilágot (Capone és mtsai 2004; Zhao és mtsai, 2007). Az elmúlt években új kutatások támasztották alá, hogy bizonyos környezeti körülmények mellett a ROF és RNF képesek oxidatív és nitroztatív stressz egyidejű kiváltására (Valderrama és mtsai, 2007; Molassiotis és Fotopoulos, 2011; Bai és mtsai, 2011). Ilyen környezeti körülmény lehet az alacsony hőmérséklet (Airaki és mtsai, 2012), arzén (Leterrier és mtsai, 2012a), szalinitás (Valderrama és mtsai, 2007; Leterrier és mtsai 2012b; Tanou és mtsai, 2012) vagy szárazság (Signorelli és mtsai, 2013)

mint stresszor, egyértelműen bizonyítva, hogy bizonyos stresszválaszok mind az oxidatív mind a nitrozatív stresszt magukba foglalják. Más esetekben eközben a NO és a ROF képződése közötti egyensúly határozza meg a végeredményt, mint például szója sejt kultúrában a hiperszenzitív reakció által okozott sejthalálhoz a ROF és a NO pontos egyensúlya szükséges, hiába termelődik nagy mennyiségű NO, ha elmarad az oxidatív robbanás (Delledonne és mtsai, 2001).

Ebben az összefüggésben fontos megemlíteni, hogy az S-nitrozoglutation (GSNO) és az annak lebontását katalizáló S-nitrozoglutation-reduktáz (GSNOR) (Leterrier és mtsai, 2011) lehetnek a ROF és RNF metabolizmusának kölcsönhatásának kulcsszereplői (Malik és mtsai, 2011). A GSNO, mint sejtben belüli NO raktár ismert, emellett szállító funkciót is betölt a NO metabolizmusában, mint a GSH NO általi, nem direkt S-nitrozilációs terméke (Keszler és mtsai, 2010; Broniowska és mtsai, 2013). A redukált/oxidált glutation (GSH/GSSG) arányhoz hasonlóan, ami sejt redox státuszának jó indikátora (Foyer és Noctor, 2011), a GSH/GSNO is használható lehet a sejt redox státuszának jellemzésére (A GSNO mennyisége a GSSG mennyiségével megegyező nagyságrendben található a sejtben – Airaki és mtsai, 2011), kifejezve a ROF és RNF metabolizmusa közötti egyértelmű kapcsolatot. A GSNOR a GSNO NADPH-függő redukcióját katalizálja oxidált glutationná és ammóniává, azaz a GSNO mennyiségének szabályozásával együtt a NO sejtben belüli hatásmechanizmusában tölt be fontos szerepet (Feechan és mtsai, 2005; Lee és mtsai, 2008; Chaki és mtsai, 2009; Yun és mtsai, 2011; Espunya és mtsai, 2012; Leterrier és mtsai, 2012ab).

A fentiekből is látható, hogy a réz és a cink számos ponton befolyásolhatja a növények növekedését és életfolyamatait az oxidatív és nitrozatív stresszfolyamatokra gyakorolt hatásuk révén. A vonatkozó irodalmi adatok áttekintése alapján azonban az is látható, hogy a fentiekre kifejtett hatásukkal kapcsolatban még számos felderítetlen részlet maradt, mivel a korábbi kutatások alapvetően nem esszenciális nehézfémekre (pl. kadmium) vonatkoznak. Ezek alapján Ph.D. munkám során e két esszenciális nehézfém hatásának összehasonlítását tűztem ki célul, különös tekintettel a nitrozatív valamint oxidatív stresszfolyamatok feltérképezésére.

III. Célkitűzés

Munkám során célul tűztem ki két, gazdaságilag is jelentős *Brassica* faj (*Brassica juncea* L. Czern. és *Brassica napus* L.) rézzel és cinkkel szembeni érzékenységének, valamint a két fém hatásainak összehasonlítását; a nitroztatív és oxidatív stressz-folyamatok feltérképezését. A két faj több forrás szerint jól alkalmazható fitoremediációs célokra, emellett fontos gazdasági és élelmiszeripari jelentőséggel bírnak, olajnövényként széles körben felhasználtak, így abiotikus stresszre, jelen esetben nehézfémstresszre adott válaszaiknak vizsgálata nagy fontossággal bír.

Kutatásaim során a következő kérdésekre kerestem a választ:

1. Mekkora mértékben képesek a vizsgált fajok a két nehézfém felvételére, melyik szervükben képesek akkumulálni azokat, illetve milyen változásokat okoz a réz- illetve cinkkezelés a vizsgált fajok mikroelem-háztartásában?
2. Milyen morfogenetikai változásokat okoz a réz- illetve cinkstressz, megfigyelhető-e a stressz-indukált morfogenetikai válasz kialakulása?
3. Hogyan alakul a *Brassica* fajok nehézfém-toleranciája: milyen sejtfalmódosulásokat indukál a két nehézfém a vizsgált fajok gyökereiben, valamint hogyan változik a gyökércsúcsi merisztéma életképessége a réz- illetve cinkstressz hatására?
4. A réz- és a cinkstressz okoz-e változásokat a RNF metabolizmusában, ROF-kal való interakcióikban, és kialakul-e másodlagos nitroztatív stressz a gyökérzetben? Megfigyelhető-e különbség a két *Brassica* faj esetében a nitroproteom méretének alakulásában?
5. Milyen összefüggés van a réz- és cink-indukált nitroztatív és oxidatív folyamatok valamint a *Brassica* fajok nehézfém-tűrése között?

IV. Anyagok és módszerek

IV.1. Vizsgált növények és nevelési körülmények

Vizsgálataimat két növényfaj, az indiai mustár (*Brassica juncea* L. Czern.) és az olajrepcse (*Brassica napus* L.) felhasználásával végeztem. Mindkét faj a keresztesvirágúak (*Brassicales*) rendjébe, a káposztafélék (*Brassicaceae*) családjába tartozik, ahol több nehézfém-toleráns és hiperakkumuláló faj is található, emellett gyorsan nagy biomasszát produkálnak.

Az indiai mustár és olajrepcse magjait felületi fertőtlenítés (50% (térfogat%) nátrium hipoklorit) után perlittel töltött Eppendorf-csövekbe helyeztem, amik teljes Hoagland tápoldatban úsztak (7. ábra). A tápoldat a szükséges alkotóelemeket a következő koncentrációban tartalmazta: 5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 mM KNO_3 , 2 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 0,01 mM Fe-EDTA, 10 μM H_3BO_3 , 1 μM MnSO_4 , 5 μM ZnSO_4 , 0,5 μM CuSO_4 , 0,1 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ és 10 μM AlCl_3 . A csíranövényeket kilenc napig előneveltem – ez idő alatt megjelentek első leveleik – majd a tápoldatot lecseréltem, és kiegészítettem 10, 25 és 50 μM réz-szulfát vagy, 50, 150 és 300 μM cink-szulfát oldattal. A kontroll növények réz- és cinkkezelést nem kaptak, a Hoagland tápoldatban nevelkedtek a kísérlet teljes időtartama alatt, ami 0,5 μM CuSO_4 -ot és 5 μM ZnSO_4 -ot tartalmazott. A növények üvegházi körülmények között növekedtek további hét napig, 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényerősség mellett 12/12 órás sötét/világos ciklusok, 55-60%-os relatív páratartalom és $25 \pm 2^\circ\text{C}$ hőmérséklet mellett.

A mintavétel hét nap kezelés után laboratóriumi körülmények között történt, ami minden esetben csapvizes majd desztillált vizes mosással kezdődött. A mikroszkópiás vizsgálatok esetén a megtisztított gyökereket a festésnek megfelelő pufferbe, majd a festékoldatba helyeztem, az egyéb vizsgálatoknál a további mintafeldolgozás menetét az adott módszernél ismertetem.



7. ábra: Növénynevelési körülmények. A nagyobb edényekben a több biomasszát igénylő kísérletek növényeit neveltem, míg a poharakban a morfológiai változások bemutatására szolgáló, elkülönített növényeket.

IV.2. Elemtartalom-vizsgálat

A mikroelemek mennyiségének méréséhez induktívan csatolt plazma tömegspektrometriát (ICP-MS, Thermo Scientific XSeries II, Asheville, USA) használtam Lehotai és mtsai. (2012) módszere szerint. A kontroll illetve a nehézfém-kezelt növények gyökereit és hajtásait elkülönítettem, és desztillált vizes mosás után 72 órán át 70°C-on szárítottam őket. Ezután 65%-os (w/v) salétromsavat és 30%-os (w/v) hidrogén-peroxidot adtam a száraz növényi anyaghoz majd 200°C-on, 1600W teljesítményen roncsoltam (MarsXpress CEM, Matthews, USA) azokat 15 percig. A réz, cink és egyéb mikroelemek koncentrációit $\mu\text{g/g}$ száraz tömegben (SZT) fejeztem ki.

IV.3. Morfológiai mérések

A 7 nap kezelés után mind a hajtás mind a gyökerek friss illetve száraz tömege (g) mérésre került, csak úgy, mint a főgyökér hossza (cm) és az oldalgyökerek száma (db/gyökér) is.

IV.4. Mikroszkópos vizsgálatok

A különböző fluorofórokkal festett *Brassica* gyökereket nagy felbontású digitális kamerával (Axiocam HR, HQ CCD, Carl Zeiss, Jena, Németország) felszerelt Zeiss Axiovert 200M inverz mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Németország) vizsgáltam. A különböző festékekhez eltérő filter-szetteket használtam: filter szett 9 (exc.: 450-490 nm, em.: 515- ∞ nm) a DHE festékhez; filter szett 10 (exc.: 450-490, em.: 515-565 nm) az APF, DAF-FM, FDA és Zinpyr-1 festékekhez; filter szett 20HE (exc.: 546/12, em.: 607/80) az Amplex Red és propídium jodid festékekhez; valamint filter szett 49 (exc.: 365 nm, em.: 445/50 nm) az anilin-kék és Zinquin festékekhez. A gyökércsúcsok merisztematikus zónáinak fluoreszcencia intenzitása (pixel intenzitás) mérése a digitális felvételeken történt az Axiovision Rel. 4.8 szoftver használatával, 100 μ m átmérőjű körök területén.

IV.4.1. Cinklokalizáció a gyökércsúcsokban

A cink szöveti lokalizációjának kimutatására párhuzamosan két fluoreszcens festéket, a Zinquent illetve a Zinpyr-1-et használtam.

A Zinquin festés előtt a gyökereket PBS pufferben ekvibráltam (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,4), majd 25 μ M Zinquin (etil (2-metil-8-p-toluénszulfonamido-6-quinolyloxy)acetát) oldatban (PBS pufferben) inkubáltam egy órán át, szobahőmérsékleten, sötétben (Sarret és mtsai, 2006).

A Zinpyr-1 (4',5'-Bis[bis(2-piridilmetil)aminometil]-2',7'-diklorofluoreszcein) festés előtt a gyökereket háromszor mostam 10 mM EDTA oldatban illetve desztillált vízben, majd 3 óráig inkubáltam sötétben szobahőmérsékleten 20 μ M festékoldatban (Sinclair és mtsai, 2007).

IV.4.2. Sejtszintű cinklokalizáció meghatározása, a sejtfalak/halott sejtek jelölése

A sejtszintű cinklokalizáció meghatározása konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal (Olympus LSM 700, Olympus, Tokyo, Japan) történt. A cink sejtszintű kimutatására használt Zinpyr-1 (a festési eljárás a fent ismertetettel megegyező módon történt) fluoroforon kívül propídium-jodidot (PI) használtam a sejtfalak valamint a halott sejtek jelölésére: a gyökereket először desztillált vízzel mostam majd egy percre 3 μ g/ml PI oldatba merítettem majd

ismételten desztillált vízzel mostam azokat (Tsukagoshi és mtsai, 2010). Végül a mintákat PBS pufferben tárgylemezre helyeztem.

A fluoreszcensen jelölt minták gerjesztése 488 nm-es, 100 mW-os argonion lézerrel történt, továbbá a minták vizsgálatához egy húszszoros víz immerziós objektívlencsét használtam. A fluoreszcencia emisszió detektálására fluoreszcein-izotiocianát (FITC) és PI filtereket alkalmaztam. A felvételek készítése a Fluoview FV100 szoftver segítségével történt, elemzésüket pedig a Fiji programmal végeztem el (<http://fiji.sc/Fiji>, Schindelin és mtsai, 2012).

IV.4.3. Sejtfalmódosulások vizsgálata a gyökérben

A gyökércsúcsi sejtek sejtfalaiba berakódó kallózt Cao és mtsai. (2011) módosított módszere alapján mutattam ki. A gyökereket desztillált vizes mosás után anilin-kék (0,1 w/v%, 1M glicin) oldatban inkubáltam öt percre, majd ismételt desztillált vizes mosás után tárgylemezre helyeztem azokat.

A sejtfalak lignifikációjának kimutatására a gyökerekben a Wiesner-teszten alapuló sósavas floroglucinol festést alkalmaztam (Adler és mtsai, 1948). Desztillált vizes mosás után a gyökereket 1 w/v%-os floroglucinolban (6N HCl-ben oldva) öt percre inkubáltam, majd a festőoldatot desztillált vízre cseréltem, és a mintákat tárgylemezre helyeztem.

IV.4.4. Lipidperoxidáció vizsgálata a gyökércsúcsokban

A lipidperoxidáció termékeit (pl. malondialdehidek) a Schiff reagenssel tettem láthatóvá a gyökércsúcsokban (Arasimowicz-Jelonek és mtsai, 2009). A gyökerek 20 percre inkubálódtak a festékoldatban majd azt lecseréltem 0,5 tömegszázalékos $K_2S_2O_5$ oldatra (0,05 M HCl-ben elkészítve), amiben újabb 20 percre inkubálódtak.

IV.4.5. Gyökércsúcsi merisztémák életképességének vizsgálata

A gyökércsúcsi merisztematikus régió sejtjeinek életképességének meghatározásához fluoreszcein diacetát (FDA) festéket használtam (Lehotai és mtsai, 2011). A gyökereket MES/KCl (2-N-morfolin-etánszulfonsav/kálium-klorid) pufferben (10/50 mM, pH 6,15) mostam majd 10 µM FDA oldatban inkubálódta 25 percig. A mintákat négyszeri MES/KCl-es mosást követően helyeztem tárgylemezre.

IV.4.6. Reaktív oxigén- és nitrogénformák kimutatása

A szuperoxid gyökanion vizualizációjához dihidroetídiumot (DHE) használtam Kolbert és mtsai. (2012) módszere alapján: a gyökereket fél órán keresztül inkubáltam 10 µM DHE oldatban 37°C-on sötétben, majd két alkalommal mostam azokat Tris-HCl pufferrel (10 mM, pH 7,4).

A hidrogén peroxid detektálásához a gyökereket fél órán át 50 µM AmplifluTM (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine, ADHP vagy Amplex Red) oldatban inkubáltam szobahőmérsékleten, sötétben, majd nátrium-foszfát pufferrel (50 mM, pH 7,5) mostam azokat. (Lehotai és mtsai, 2012)

A gyökércsúcsok nitrogén-monoxid tartalmának meghatározásához DAF-FM DA (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluorescein) festéket használtam Pető és mtsai (2011) módszere alapján, kisebb módosításokkal; a gyökereket fél óráig inkubáltam 10 µM DAF-FM DA oldatban majd kétszer mostam őket Tris-HCl pufferrel (10 mM, pH 7,4).

A peroxinitrit szintjének méréséhez a gyökércsúcsokban 3'-(p-aminofenil) fluoreszceint (APF) használtam (Kolbert és mtsai, 2012). A gyökérmintákat egy óráig sötétben inkubáltam 10 µM APF oldatban, majd kétszer kerültek mosásra Tris-HCl pufferrel (10 mM, pH 7,4).

IV.5. Az enzimatisz antioxiáns rendszer elemeinek vizsgálata

A szuperoxid dizmutáz (SOD) (EC 1.15.1.1) aktivitásának mérése a nitroblue tetrazólium klorid (NBT) riboflavin jelenlétében történő fotokémiai bontásának gátlásán alapul (Dhindsa és mtsai, 1981). Az enzimkivonathoz 250 mg növényi anyagot dörzsöltem el 10 mg polivinil-

polipirrolidon hozzáadásával 1 ml 50 mM foszfát pufferben (pH 7,0; 1 mM EDTA). Az enzim aktivitását unit/g friss tömeg egységben ábrázoltam, ahol egy unit SOD aktivitás 50%-os NBT-bontás gátlásnak felel meg.

Az aszkorbát peroxidáz (APX) (EC 1.11.1.11) aktivitásának mérése Nakano és Asada (1981) módszere alapján történt, kisebb módosításokkal, ahol az aszkorbáttartalom változását mértem 265 nm-en. Az enzimkivonat készítéséhez 250 mg növényi anyagot tartam fel 1,5 ml extrakciós pufferrel, ami 1 mM EDTA-t, 50 mM NaCl-t és 900 μ M aszkorbátot tartalmazott. Az enzimaktivitás-értékek unit/g friss tömeg értékeként kerültek ábrázolásra.

IV.6. Immunoprecipitáció, SDS-PAGE és Western blot

A teljes fehérjekivonatot nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) előtt Thermo Scientific Pierce Crosslink Magnetic IP/CoIP kittel (Hudson, NH, USA) tisztítottam 3-nitrotirozin elleni antitest felhasználásával. Az immunoprecipitáció után a tisztított kivonatban lévő fehérjéket SDS poliakrilamid gélen (4% stacking, 12% running) elválasztottam. A Western blot analízishez az elválasztott fehérjéket polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra transzfereltem; transzfer után a membránokat 3-nitrotirozin elleni elsődleges antitesttel inkubáltam (1:2000) 4°C-on egy éjszakán át (Corpas és mtsai, 2008). Az immuno-detekció a megfelelő, alkalikus foszfátázzal konjugált másodlagos antitesttel (1:10000), a sávok előhívása NBT/BCIP reakcióval történt.

IV.7. Statisztikai analízis

Az eredmények átlag \pm standard hiba (SE) formátumban kerültek ábrázolásra. A többszörös összehasonlító tesztek a SigmaStat 12 szoftverrel végeztem, variancia (ANOVA, $P < 0,05$) analízis és Duncan's teszt felhasználásával. Egyes esetekben a Microsoft Excel 2010 Student-féle t-próbáját alkalmaztam (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$). Minden kísérletet legalább kétszer megismételtem. A festési módszerek esetén 10, a morfológiai méréseknél legalább 15-20 minta került elemzésre. A többi mérési módszer esetén a mintaszám 6 volt.

V. Kutatási eredmények

V.1. Nehézfémfelvétel

V.1.1. A réz és a cink felvétele a gyökerekbe, transzport a hajtásba

A kontroll valamint a 10, 25 és 50 μM réz-szulfát tartalmú tápoldatban hét napig nevelt *B. juncea* és *B. napus* növények Cu tartalmát ICP-MS technikával határoztam meg, így nyomon követhető volt a Cu felvétele a gyökérrendszerbe és transzportja a hajtásba. Az eredmények alapján elmondható, hogy mindkét vizsgált faj hasonló rézfelvételi hatékonyságot mutatott a gyökérrendszert tekintve, az alkalmazott rézkezelés koncentrációja valamint a növények réztartalma egyenes arányban állt egymással, lényegi különbség csupán a legalacsonyabb alkalmazott rézkezelés (10 μM) esetén volt látható, ahol a *B. napus* 50%-kal több rezet akkumulált a gyökérrendszerében. 25 μM rézkezelés esetén ez a különbség már csupán 10%, míg a legmagasabb rézkezelés hatására a tendencia megfordul, és a *B. juncea* gyökereiben 8%-kal több réz halmozódott fel, mint a *B. juncea* esetén (1. táblázat).

1. táblázat: Rézkezelt *Brassica* növények gyökerének réztartalma ($\mu\text{g/g}$ SZT). A kontrollhoz képest minden kezelés minden esetben legalább $P \leq 0,001$ (***) valószínűségi szinten szignifikánsan különböző értékeket eredményezett ($n=6$).

			Átlag	SE
Cu koncentráció - gyökér ($\mu\text{g/g}$ SZT)	<i>B. juncea</i>	Kontroll	24,5	0,28
		10 μM Cu	475,3	7,97
		25 μM Cu	1666	37,22
		50 μM Cu	3531	11
	<i>B. napus</i>	Kontroll	27,68	0,13
		10 μM Cu	713,2	5,23
		25 μM Cu	1849	10,38
		50 μM Cu	3260	35,09

A külső rézkoncentráció növelésével bizonyos fokú transzlokáció megfigyelhető volt a hajtások irányába is, viszont a mért értékek egy nagyságrenddel alacsonyabbak voltak a gyökérben mérteknél. Jól látható, hogy az alacsonyabb alkalmazott rézkezelések esetén nem

volt nagy különbség a két vizsgált faj transzlokációs képessége között, azonban a legnagyobb (50 μM) rézkezelés hatására a *B. juncea* majdnem kétszer annyi rezet transzportált a hajtásaiba, mint a *B. napus* (2. táblázat).

2. táblázat: Rézkezelt *Brassica* növények hajtásának réz tartalma ($\mu\text{g/g}$ SZT). A kontrollhoz képest minden kezelés minden esetben legalább $P \leq 0,001$ (***) valószínűségi szinten szignifikánsan különböző értékeket eredményezett ($n=6$).

			Átlag	SE
Cu koncentráció - hajtás ($\mu\text{g/g}$ SZT)	<i>B. juncea</i>	Kontroll	12,93	0,66
		10 μM Cu	45,35	1,52
		25 μM Cu	65,22	1,28
		50 μM Cu	162,2	4,15
	<i>B. napus</i>	Kontroll	18,52	0,33
		10 μM Cu	40,5	1,75
		25 μM Cu	66,6	1,01
		50 μM Cu	85,34	2,32

A rézstressznek kitett növényekhez hasonlóan, a tápoldathoz adott cink-szulfát mennyiségével párhuzamosan a gyökerek cinktartalma szignifikánsan növekedett. A két vizsgált *Brassica* faj cinkfelvételi képessége között nem mutatkozott érdemi különbség, habár a legmagasabb alkalmazott cinkkezelés esetén a *B. juncea* 14 %-kal több cinket volt képes a gyökérrendszerébe felvenni, mint a *B. napus* (3. táblázat).

3. táblázat: Cinkkezelt *Brassica* növények gyökerének cinktartalma ($\mu\text{g/g}$ SZT). A kontrollhoz képest minden kezelés minden esetben legalább $P \leq 0,001$ (***) valószínűségi szinten szignifikánsan különböző értékeket eredményezett ($n=6$).

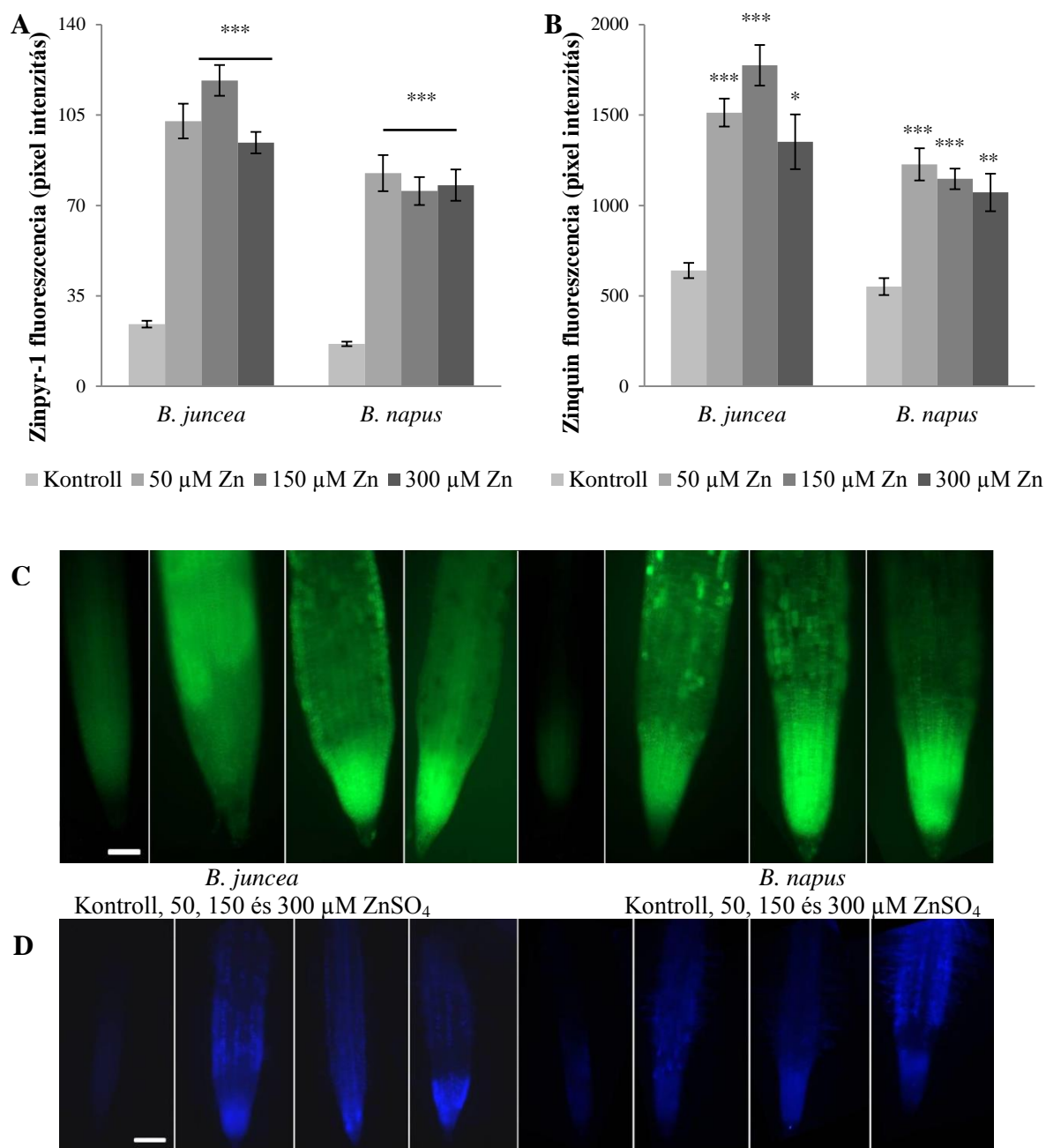
			Átlag	SE
Zn koncentráció - gyökér ($\mu\text{g/g}$ SZT)	<i>B. juncea</i>	Kontroll	212,8	0,58
		50 μM Zn	14570	2401,2
		150 μM Zn	31110	75,58
		300 μM Zn	52530	138,22
	<i>B. napus</i>	Kontroll	258,4	1,5
		50 μM Zn	14900	2,95
		150 μM Zn	32490	66,51
		300 μM Zn	45980	64,66

A hajtást vizsgálva megállapítható, hogy a növekvő mennyiségű hozzáadott cink koncentrációfüggő emelkedést okozott annak cinktartalmában, azonban ezek az értékek egy nagyságrenddel kisebbek voltak, mint a gyökérrendszerben tapasztaltak esetén, csakúgy, mint a rézkezelés hatására. A két faj között jelentős különbség fedezhető fel a transzportálási hatékonyságban: a *B. napus* hajtásrendszere minden alkalmazott cinkkezelés után nagyobb mennyiségű cinket tartalmazott, mint a *B. juncea*, ez különösen az 50 μM (52%) és a 150 μM (66%) cinkszulfát-kezelésnél volt jelentős (4. táblázat).

4. táblázat: Cinkkezelt *Brassica* növények hajtásának cinktartalma ($\mu\text{g/g}$ SZT). A kontrollhoz képest minden kezelés minden esetben legalább $P \leq 0,001$ (***) valószínűségi szinten szignifikánsan különböző értékeket eredményezett ($n=6$).

			Átlag	SE
Zn koncentráció - hajtás ($\mu\text{g/g}$ SZT)	<i>B. juncea</i>	Kontroll	89,25	0,43
		50 μM Zn	831,9	8,45
		150 μM Zn	1931	7,44
		300 μM Zn	3211	28,11
	<i>B. napus</i>	Kontroll	155,7	0,26
		50 μM Zn	1598	27,68
		150 μM Zn	2880	5,12
		300 μM Zn	3727	8,3

V.1.2. A cink szöveti és intracelluláris lokalizációja

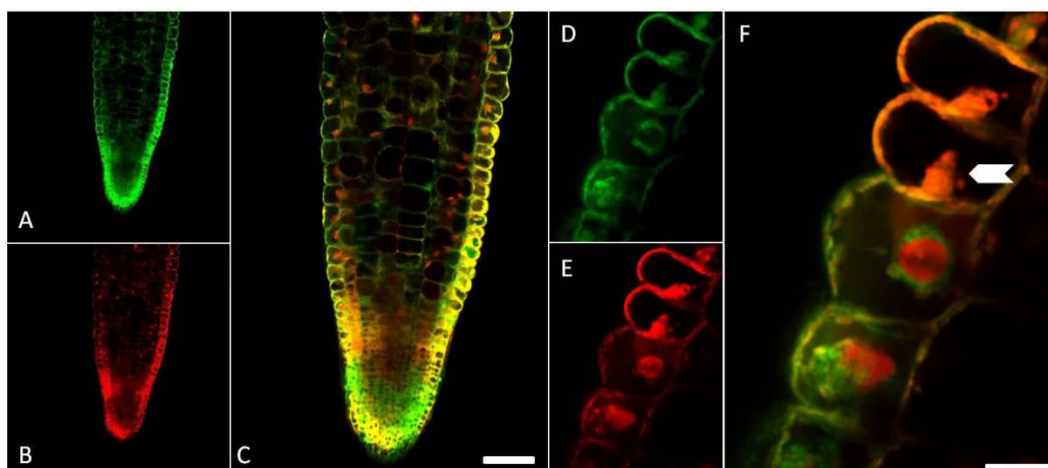


8. ábra: A cink mennyiségének változása a cinkkezelt *Brassica* növények gyökércsúsaiban (merisztematikus zóna). A: Zinpyr-1 fluoreszcencia, B: Zinquin fluoreszcencia, valamint reprezentatív mikroszkópos fotók Zinpyr-1 (C) és Zinquin (D) fluorofórral jelölt *Brassica* gyökércsúcsokról (Mérce=0,2 mm). A *-gal jelölt értékek a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján ($n=10$).

A gyökércsúcsok cinktartalmának meghatározására két fluorofórt, Zinquin-t és Zinpyr-1-et használtam, amik segítségével felderíthető a gyökérbe felvett cink szöveti eloszlása valamint következtethetünk annak mennyiségére is. A kontroll növények gyökereiben homogén

eloszlású, alacsony intenzitású cink-függő fluoreszcenciát detektáltam, ami jelentősen megváltozott a kezelés hatására. Cinkstressz esetén a cink-függő fluoreszcencia intenzitása szignifikánsan emelkedett a merisztematikus régióban, míg a felsőbb zónákban alacsony maradt (8. ábra C és D). A *B. juncea* merisztematikus zónájában mérhető Zinquin és Zinpyr-1-fluoreszcencia magasabbnak bizonyult, azonban a *B. napus* esetén is szignifikánsan emelkedett cinkkezelés hatására (8. ábra A és B).

A sejtszintű cinklokalizációt a propídium-jodid és Zinpyr-1 fluorofórok együttes alkalmazásával vizsgáltam. A propídium-jodid a sejtmagban található DNS-hez kötődik, azonban képtelen átjutni az élő sejtek plazmamembránján, így vagy a halott sejtek, vagy a sejtfalak jelölésére használható (9. ábra B és E). A képek alapján egyértelműen látszik, hogy a gyökérben felhalmozódott cink (9. ábra A és D) nagy része a sejtfalakhoz kötődik, amit a Zinpyr-1-ből származó zöld és a propídium-jodidból származó vörös fluoreszcencia emisszió kolokalizációja (sárga szín) jelez (9. ábra C és F). Érdekes, hogy az epidermiszsejtek nagy részében a sejtmag festődött propídium-jodiddal, azaz ezek már nem élő sejtek; ugyanitt a sejtmagokban nagy mennyiségű cink található, ami azok alakjának megváltozásával jár (9. ábra F).



9. ábra: Cinkkezelt (300 μM ZnSO_4) *Brassica juncea* gyökércsúcsról készített reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek. Teljes gyökércsúcsról készített, kisebb nagyítású kép (A-C), valamint az epidermális sejtréteg egy részletét bemutató nagyobb nagyítású fotók (D-F). Az A és D képen Zinpyr-1-el, a B és E képen propídium-jodiddal festett gyökér-részlet látható, a C és F képen ezek kolokalizációja sárga színnel látszik. A cinket tartalmazó sejtmagot nyíl jelöli. (Mércék C: 0,1 mm, F: 0,2 mm)

V.2. Nehézfém-indukált változások a mikroelemek homeosztázisában

V.2.1. A réz és cink hatása a mikroelem-homeosztázisra

A gyökérrendszerben található réz mennyisége mellett más mikroelemek (Zn, Mn, Fe) mennyiségét is meghatároztam a két fajban rézkezelés után. Az eredmények alapján elmondható, hogy mindhárom vizsgált mikroelem mennyisége a legtöbb esetben szignifikánsan csökkent, azonban a csökkenés nem bizonyult koncentrációfüggőnek. Kivételt képez a Fe szintje *B. juncea* esetén ahol az enyhe és közepes (10 és 25 μM) rézkezelés megemelte annak mennyiségét (5. táblázat).

5. táblázat: Zn, Mn és Fe koncentráció a rézkezelt *Brassica* fajok gyökerében. A kontrollhoz képest minden kezelés minden mikroelem esetében legalább $P \leq 0,001$ (***) valószínűségi szinten szignifikánsan különböző értékeket eredményezett ($n=6$).

	Kontroll	10 μM Cu	25 μM Cu	50 μM Cu
<i>Brassica juncea</i>				
Zn	212,8 \pm 1,01	94,16 \pm 1,22	109,6 \pm 1,1	109,5 \pm 1,49
Mn	250 \pm 2,01	38,6 \pm 0,39	34,03 \pm 1,68	41,46 \pm 0,12
Fe	519,1 \pm 8,23	786,6 \pm 2,25	580,1 \pm 2,04	403,4 \pm 4,57
<i>Brassica napus</i>				
Zn	258,4 \pm 2,59	120,7 \pm 1,34	104,6 \pm 1,16	89,05 \pm 1,45
Mn	145,1 \pm 0,92	46,21 \pm 0,38	35,91 \pm 1,49	33,64 \pm 0,21
Fe	1051 \pm 7,77	750,1 \pm 2,28	556,8 \pm 3,28	548,6 \pm 3,43

A cinkkezelés után a cink mennyisége mellett más mikroelemek (Cu, Mn, Fe) mennyisége is meghatározásra került a vizsgált két, cinkkel kezelt *Brassica* faj gyökereiben is. Az alkalmazott cinkkezelések a réz mennyiségének megemelkedését okozták mindkét *Brassica* faj gyökérrendszerében.

A réz mennyiségéhez hasonlóan, a gyökerekben mérhető vas koncentrációja enyhe, de szignifikáns emelkedést mutatott mindkét faj esetén. Ezekkel szemben mindhárom alkalmazott cinkkezelés jelentős csökkenést okozott mindkét faj gyökérrendszerének mangántartalmában hasonlóan a rézterheléshez (6. táblázat).

6. táblázat: Cu, Mn és Fe koncentráció a cinkkezelte *Brassica* fajok gyökerében. A kontrollhoz képest minden kezelés minden mikroelem esetében legalább $P \leq 0,001$ (***) valószínűségi szinten szignifikánsan különböző értékeket eredményezett (n=6).

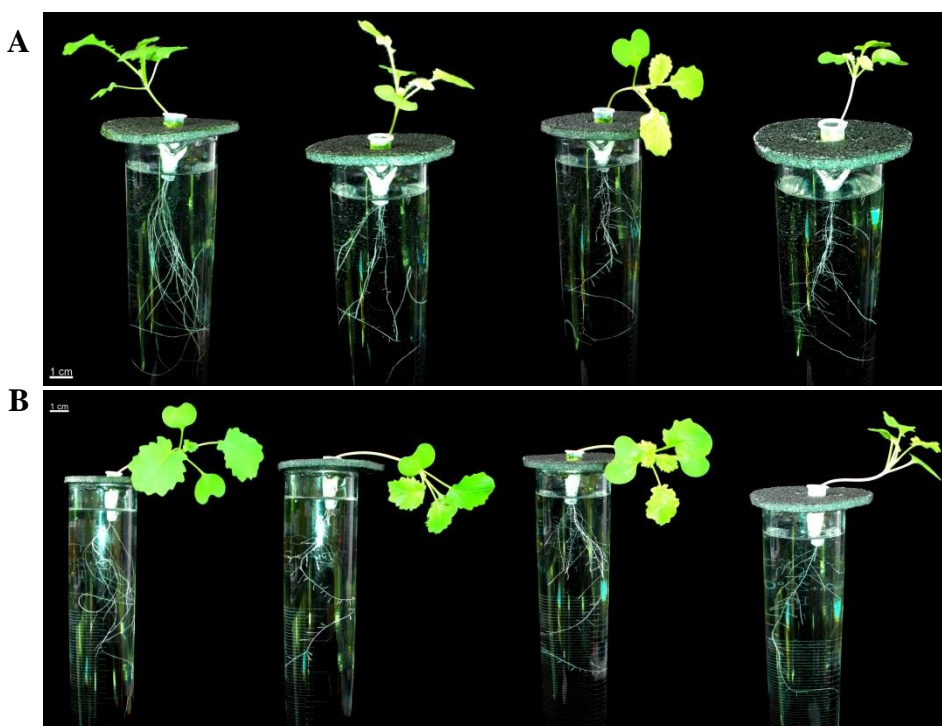
	Kontroll	50 μM Zn	150 μM Zn	300 μM Zn
<i>Brassica juncea</i>				
Cu	24,5 \pm 0,38	173 \pm 0,52	198,9 \pm 0,49	174,8 \pm 0,73
Mn	250 \pm 1,16	24,97 \pm 0,05	25,53 \pm 0,07	26,02 \pm 0,13
Fe	519 \pm 4,75	864,5 \pm 3,65	869,9 \pm 2,71	927,9 \pm 2,22
<i>Brassica napus</i>				
Cu	27,68 \pm 0,08	150,6 \pm 0,5	178,6 \pm 0,85	163,7 \pm 0,68
Mn	145,1 \pm 0,53	26,4 \pm 0,09	22,02 \pm 0,1	26,44 \pm 0,17
Fe	1051 \pm 4,5	1496 \pm 6,7	1540 \pm 11,3	1239 \pm 7,8

V.3. Réz- és cink-indukált növekedési válaszok



10. ábra: A réz hatása a *B. juncea* (A) és *B. napus* (B) növekedésére. Balról jobbra a kezelések sorrendje: kontroll, 10, 25 és 50 μM CuSO_4 . Mércse= 1 cm.

Rézkezelés hatására mindkét vizsgált faj látványos növekedésgátlást szenvedett el (10. ábra). A hajtás mérete az alkalmazott rézkoncentrációk emelkedésével párhuzamosan csökkent, de a csökkenés arányában eltérés mutatkozott a két faj között. Míg *B. juncea* esetén a hajtás friss tömege a kontroll 72 (10 μM rézkezelés) majd 60 %-ára (25 és 50 μM rézkezelés) csökkent, addig a növekedésgátlás mértéke erősebb volt a *B. napus* hajtásban, a 10, 25 és 50 μM rézkezelésnek kitett növények hajtás friss tömege rendre a kontroll 65, 48 és 36%-ára csökkent. A növekedésgátlás mellett mindkét faj levelein klorózisos területek voltak megfigyelhetők, azonban látványos, sejtelhalásra utaló nekrotikus léziókat nem észleltem.

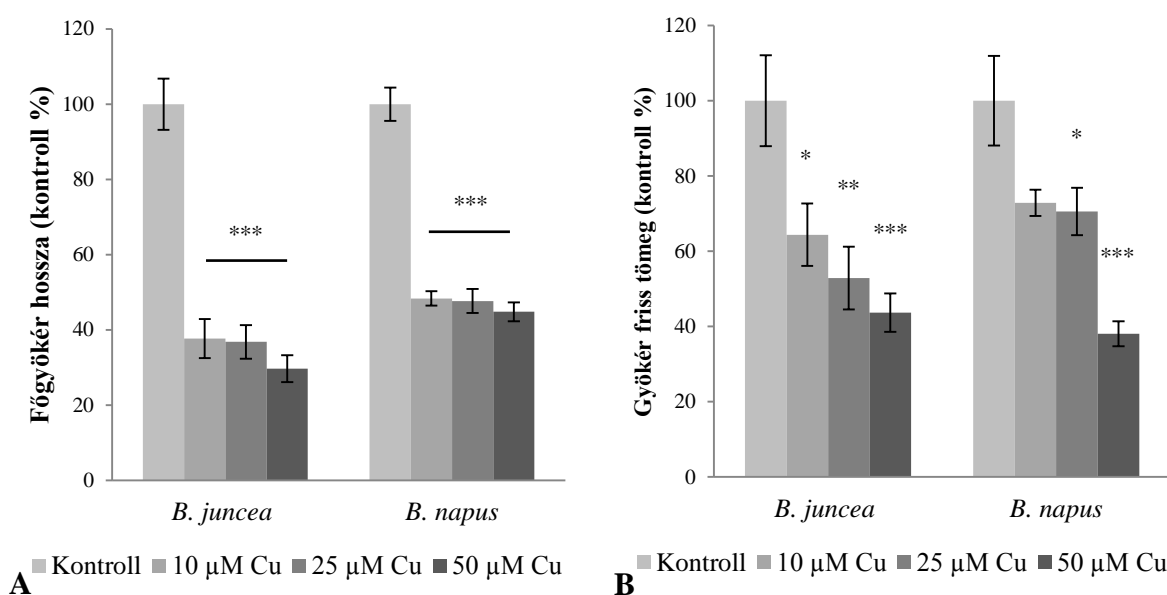


11. ábra: A cink hatása a *B. juncea* (A) és *B. napus* (B) növekedésére. Balról jobbra a kezelések sorrendje: kontroll, 50, 150 és 300 μM ZnSO_4 . Mércse= 1cm.

A cinkkezelés, hasonlóan a már bemutatott rézkezeléshez, jelentős csökkenést okozott a vizsgált fajok növekedésében (11. ábra). Mindkét faj esetében jelentősen csökkent a hajtás mérete. A két faj hajtásnövekedés-gátlása között kisebb különbséget tapasztaltam, mint rézkezelés esetén, de cinkstressz hatására szintén a *B. napus* hajtásmérete csökkent nagyobb mértékben (*B. juncea*: Kontroll 100%, 50 μM Zn 78%, 150 μM Zn 66%, 300 μM Zn 56%; *B. napus*: Kontroll 100%, 50 μM Zn 76%, 150 μM Zn 56 %, 300 μM Zn 51%). A cinkkezelés szintén klorotikus foltok megjelenését okozta a levéllemezeken, viszont nekrotikus léziók ebben az esetben sem voltak láthatók.

V.3.2. A réz és cink hatása a *Brassica* fajok gyökérnövekedésére

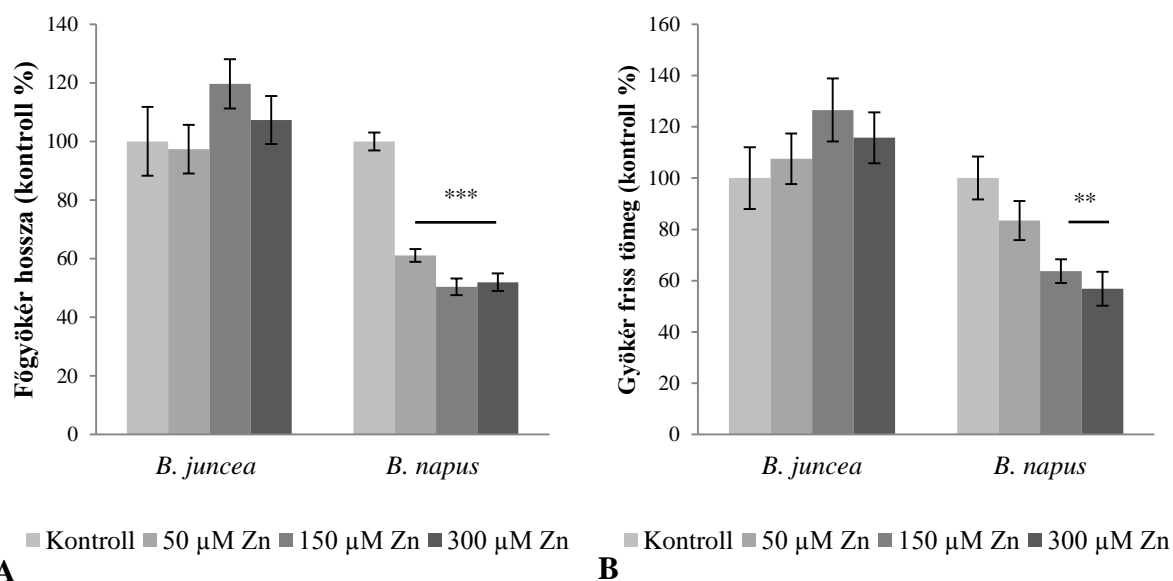
Mindkét vizsgált faj gyökérrendszere komoly növekedésbeli változásokat mutatott rézkezelés hatására. A főgyökér hossza mindkét faj esetében szignifikáns, az alkalmazott réz koncentrációjától független csökkenést mutatott (12.A ábra).



12. ábra: Rézkezelte *Brassica* fajok főgyökérhossza (A) és gyökérrendszer friss tömege (B) (kontroll %). A *-gal jelölt értékek a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján ($n=15$).

Ezzel szemben a teljes gyökérrendszer friss tömege koncentráció-függő módon csökkent, valamint a *B. napus* esetében a 10 és 25 µM rézszulfát- kezelés kisebb csökkenést okozott a friss tömegben, mint amelyet a *B. juncea* esetén tapasztaltam (12.B ábra).

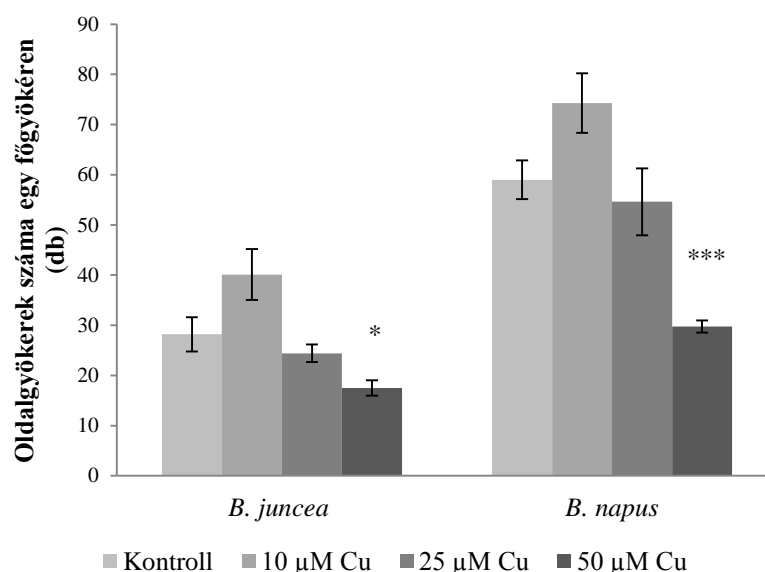
Érdekes különbség, hogy míg a réz mindkét faj főgyökérhosszát és friss tömegét jelentősen csökkentette, cinkkezelés hatására a két vizsgált faj eltérő reakciót mutatott ugyanezen két paraméter tekintetében. A *B. juncea* főgyökérének hossza nem csökkent az alkalmazott cinkkezelések miatt. Ezzel szemben a *B. napus* főgyökérhossza szignifikánsan csökkent, ez azonban nem függött az alkalmazott kezelés mértékétől (13.A ábra).



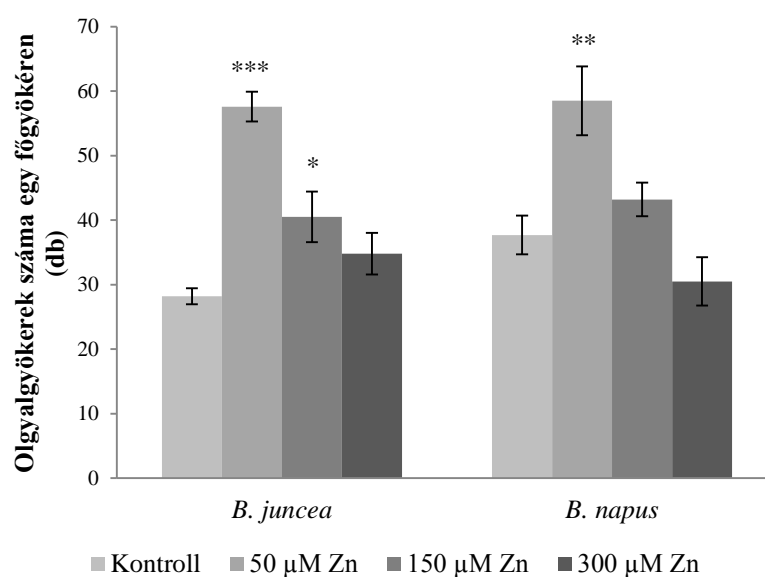
13. ábra: Cinkkezelt *Brassica* fajok főgyökérhossza (A) és gyökérrendszer friss tömege (B) (kontroll %). A *-gal jelölt értékek a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján ($n=15$)

A gyökérrendszer friss tömegének változása a főgyökerek hosszához hasonló tendenciát mutatott. A *B. juncea* esetén az összes alkalmazott cinkkoncentráció kis mértékben megemelte a friss tömeget, ez a hatás a 150 µM-os kezelésnél volt a legszembetűnőbb. Eközben a *B. napus* gyökerek friss tömege koncentrációfüggő csökkenést mutatott (13.B ábra).

Az oldalgyökerek számának vizsgálata érdekes jelenségre derített fényt. Mindkét faj esetén a legalacsonyabb alkalmazott rézszulfát-kezelés (10 µM) jelentős, azonban statisztikailag nem szignifikáns emelkedést okozott az oldalgyökerek számában, a 25 µM CuSO_4 kezelés kicsivel a kontroll szintje alá, a legmagasabb rézkezelés pedig szignifikáns módon csökkentette az oldalgyökerek számát. A 300 µM rézszulfát-kezelés hatására tapasztalt oldalgyökérszám-csökkenés a *B. napus* esetén volt jelentősebb (14. ábra).



14. ábra: Rézkezelt *Brassica* növények oldalgökörszáma (db). A *-gal jelölt értékek a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján (n=15).



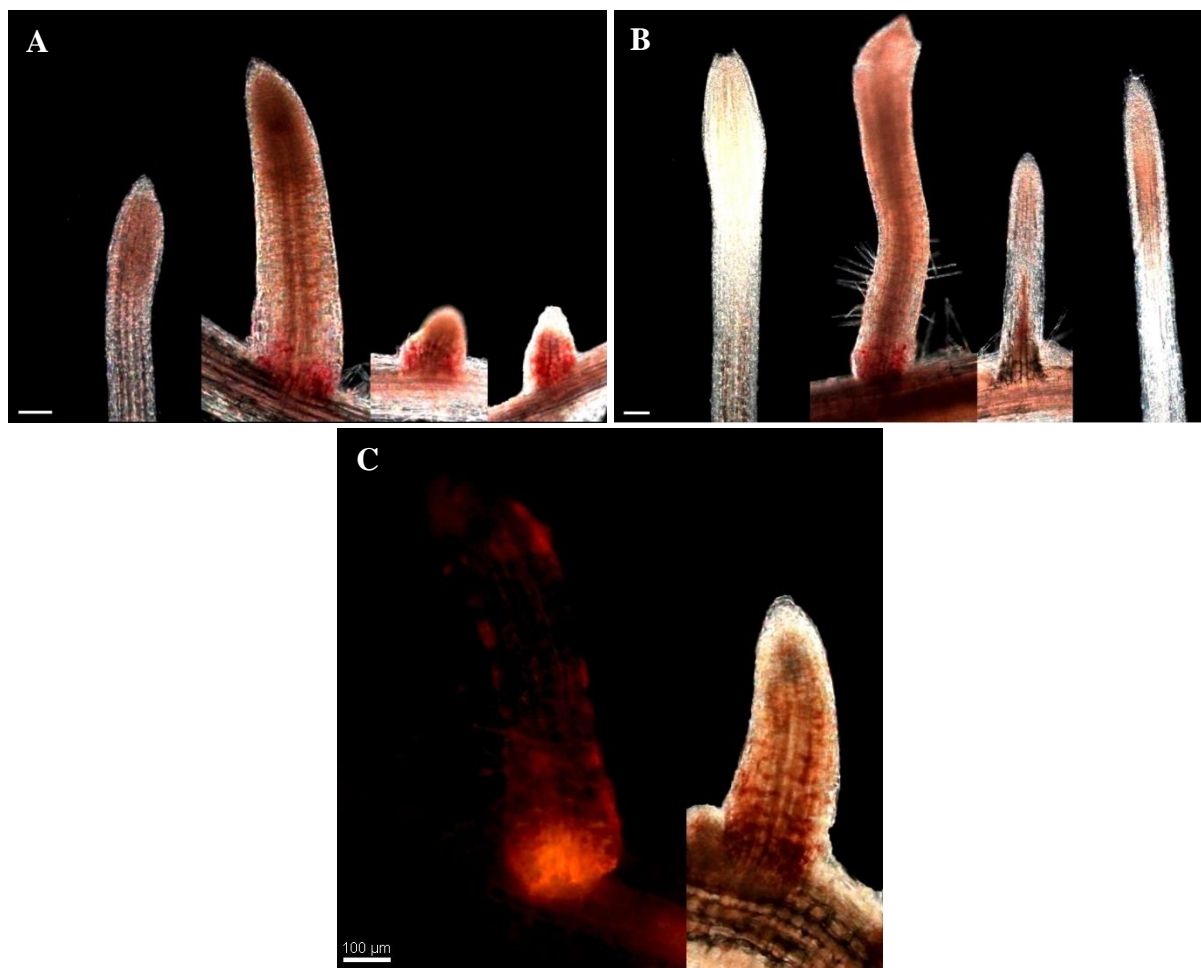
15. ábra: Cinkkezelt *Brassica* növények oldalgökörszáma (db). A *-gal jelölt értékek a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján (n=15).

A cinkszulfát-kezelés jóval erőteljesebb hatást gyakorolt a két faj oldalgökörszámára: a oldalgökörek száma a legalacsonyabb (50 µM) cinkkezelésnek köszönhetően szignifikánsan megemelkedett. Eltérést tapasztaltam az oldalgökörszám emelkedés mértékében is, *B. juncea* esetén 103, míg *B. napus* esetén csupán 56%-os emelkedést mértem. További különbség,

hogy a *B. juncea* esetén a közepes (150 μ M) alkalmazott cinkkoncentráció is megemelte az oldalgyökerek számát (15. ábra).

V.4. Réz- és cink-indukált sejtfalmódosulások

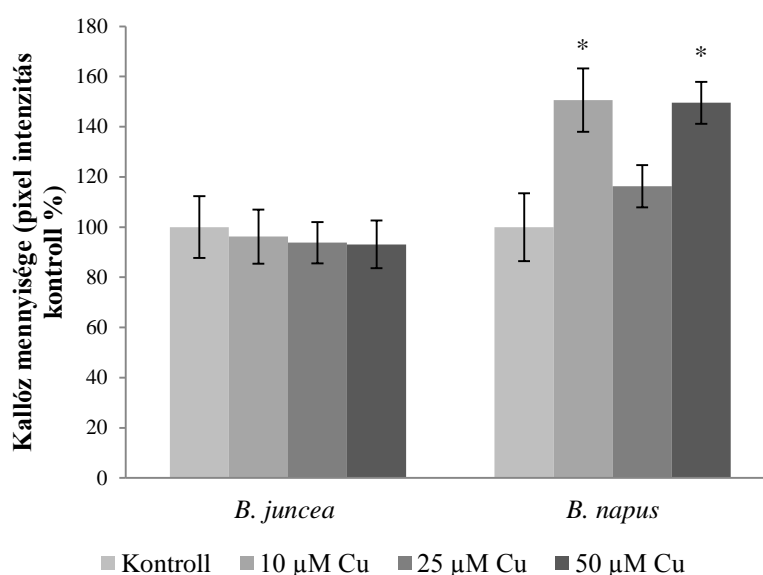
A rézkezelés által kiváltott lignifikációt a gyökérrendszerben sósavas floroglucinol festéssel vizsgáltam. Érdekes módon a festés csupán az oldalgyökerek eredése környékén mutatott ligninberakódást, ez mindkét fajban, minden alkalmazott rézkoncentráció esetén látható volt, a festődés intenzitása *B. juncea* esetén egy kicsivel erősebbnek mutatkozott (16. ábra A és B). Az oldalgyökerek tövében kimutatott réz-indukált ligninfelhalmozódás kolokalizációt mutatott hidrogén-peroxiddal (16.C ábra).



16. ábra: Reprezentatív fotók a *B. juncea* (A) és *B. napus* (B) gyökérrendszerében történő lignifikáció kimutatásáról, valamint a hidrogén-peroxid (vörös rezorufin fluoreszcencia) és lignin kolokalizációja (C) (Mérce=0,1 mm).

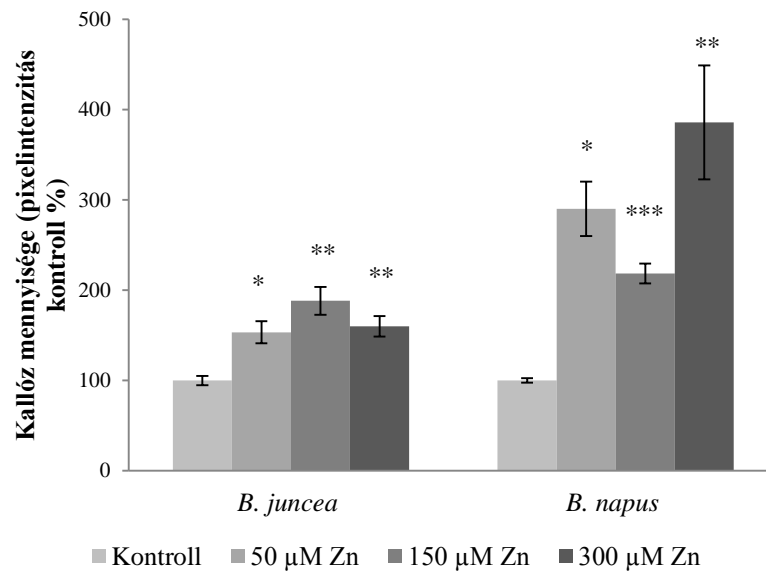
Cink hatására nem tapasztaltam a réz esetében kimutatható, hidrogénperoxid-függő lignifikációt.

A sejtfalakba berakódó kallóz kimutatásra anilinkék-festést használtam, aminek fluoreszcencia-intenzitását a gyökércsúcsok merisztematikus zónájában mértem. *B. juncea* esetén egyik alkalmazott rézkezelés sem okozott emelkedést a merisztematikus zóna sejtfalainak kallóztartalmában, ezzel szemben *B. napus* esetén az alacsony (10 μ M) és magas (50 μ M) rézszulfát-kezelés enyhe emelkedést okozott a poliszacharid mennyiségében (17. ábra).



17. ábra: A kallóz mennyiségének változása a rézkezelt *Brassica* fajok gyökércsúcsaiban. A *-gal jelölt értékek a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján.

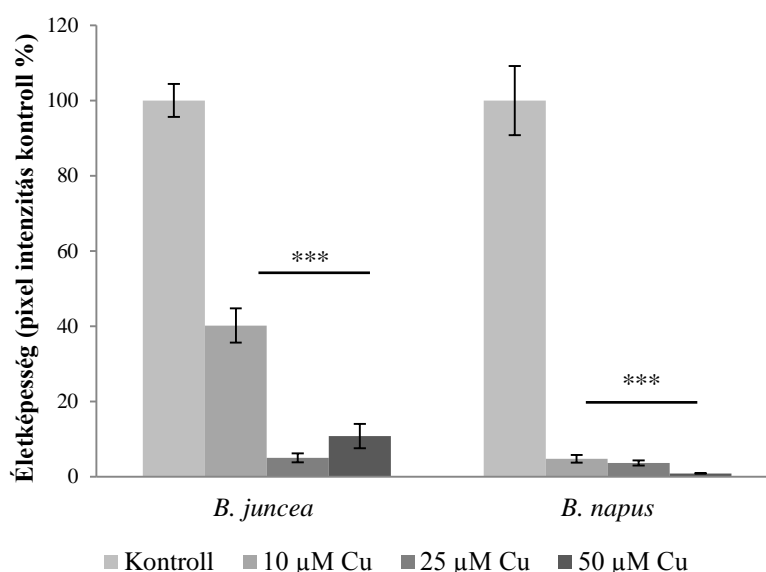
Ezzel szemben az anilinkék-festés kimutatta, hogy cink hatására mindkét fajban szignifikáns mennyiségű kallóz rakódott be a merisztematikus zóna sejtfalaiba; a berakódás mértéke *B. napus* esetén volt jelentősebb (18. ábra).



18. ábra: A kallóz mennyiségének változása a cinkkezelt *Brassica* fajok gyökércsúcsaiban. A *-gal jelölt értékek a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján (n=10).

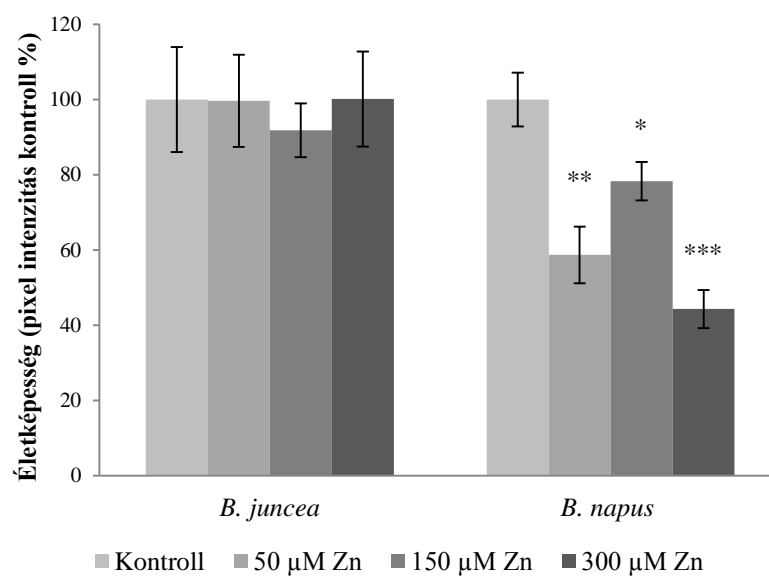
V.5. A nehézfém-érzékenység indikátora a gyökércsúcsban – a gyökércsúcsi merisztéma életképessége

A gyökércsúcsi merisztémák életképességét fluoreszcein diacetát festéssel vizsgáltam, ami mindkét fajban szignifikáns életképesség-csökkenést jelzett rézkezelés hatására (19. ábra). A 10 μM -os rézszulfát-kezelés láthatóan kevésbé csökkentette a *B. juncea* gyökércsúcsi merisztémáinak életképességét, valamint a legmagasabb (50 μM) alkalmazott kezelés esetén is magasabb volt a sejtek életképessége, mint a *B. napus* gyökércsúcsaiban, miközben 25 μM réz-szulfát hatására a két faj között nem mutatkozott különbség.



19. ábra: A gyökércsúcsi merisztéma életképességének változása rézkezelt *Brassica* növényekben (kontroll %). A *-gal jelölt értékek a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján ($n=10$).

A rézkezeléssel szemben, a cinkkezelésnek kitett *Brassica* gyökerek életképességének vizsgálata alapján elmondható, hogy a két faj eltérő mértékben érzékeny a cinkstresszre. A *B. juncea* gyökércsúcsi merisztémái egyik alkalmazott cinkkezelés hatására sem veszítenek életképességükből, míg a *B. napus* gyökereinek életképessége szignifikánsan csökken, különösen igaz ez az 50 és 300 μM -os kezelések esetén (20. ábra).



20. ábra: A gyökércsúcsi merisztéma életképességének változása cinkkezelt *Brassica* növényekben (kontroll %). A *-gal jelölt értékek a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján ($n=10$).

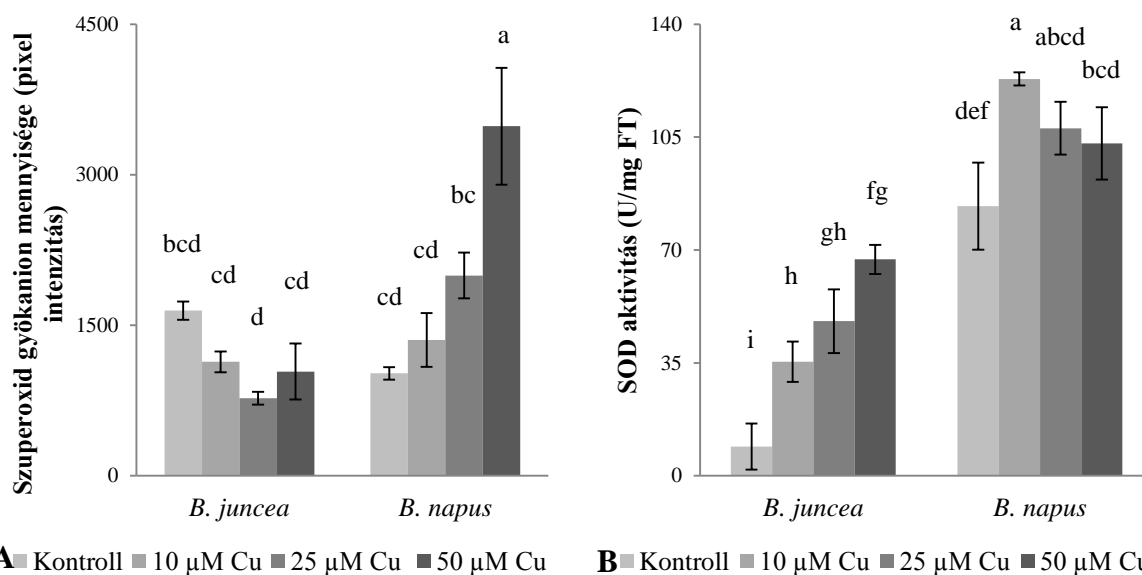
V.6. Réz- és cink-indukált változások a ROF és RNF egyensúlyában

A különböző reaktív molekulák, mint például a ROF és RNF egyensúlyának felborulása változásokat okoz a sejt redox státuszában, ami többek között szerepet játszhat az előbbieken bemutatott növekedési és egyéb válaszokban a vizsgált *Brassica* fajok gyökereiben.

A rézstressz hatását a ROF és RNF egyensúlyára a *Brassica* fajok gyökereiben különféle fluoreszcens mikroszkópiás eljárásokkal és enzimaktivitás-mérésekkel mutattam ki.

A rendszer első eleme a stressz hatására képződő szuperoxid gyökanion, aminek mennyiségére dihidroetidiumos festéssel következtettem a gyökércsúcsokban (26.A ábra). Látható, hogy míg *B. juncea* esetén az alkalmazott rézkoncentrációk emelkedésével párhuzamosan csökkenő tendencia figyelhető meg, addig a *B. napus* gyökércsúcsainak merisztematikus régiójában exponenciális, koncentrációfüggő módon emelkedett a szuperoxid gyökanion mennyisége (21.A ábra).

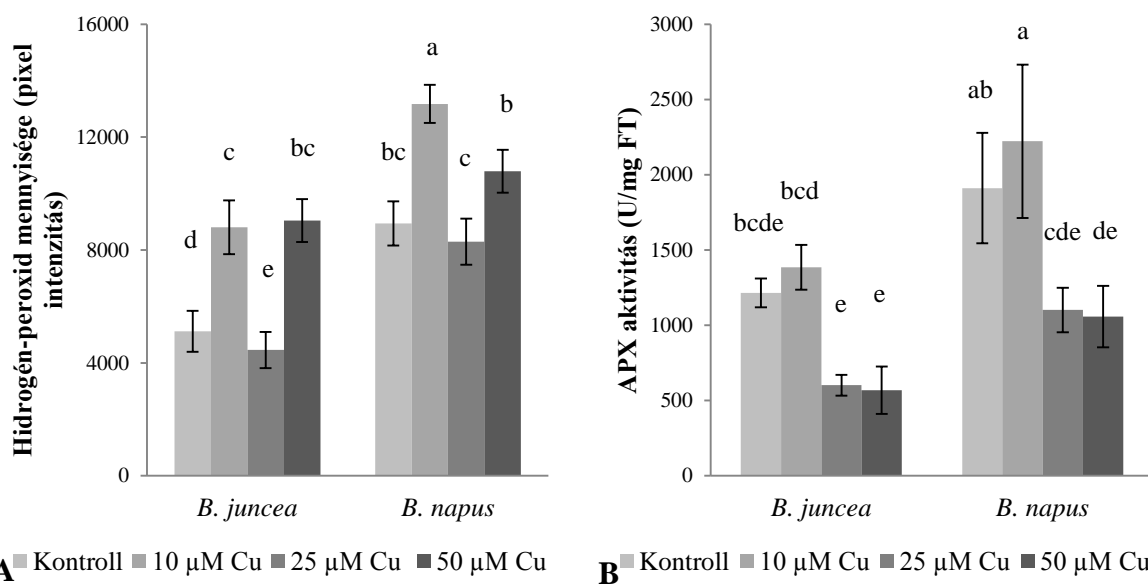
A sejtben felhalmozódó szuperoxid gyökanion lebontásáért elsősorban a SOD enzim a felelős, aminek aktivitását fotometriás módszerrel mértem. A *B. juncea* gyökereiben tapasztalt szuperoxid gyökanion mennyiségének csökkenésének hátterében koncentrációfüggő módon fokozódó SOD aktivitás áll, és bár a SOD aktivitás *B. napus* esetén is szignifikánsan megemelkedett, ez mégsem volt képes ellensúlyozni a szuperoxid gyökanion megnövekedett termelődését (21.B ábra).



21. ábra: A szuperoxid gyökanion mennyiségének (A) és az azt lebontó szuperoxid dizmutáz enzim aktivitásának (B) változása a rézkezelt *Brassica* gyökerekben. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján ($n=10$ és 6).

A SOD működésének terméke a hidrogén-peroxid, aminek mennyiségi változását Amplex Red fluoreszcens festési eljárással határoztam meg (26.B ábra). A szuperoxid gyökanoin SOD által történő lebontásának és a rézstressz hatására a hidrogén-peroxid szintje általánosságban megemelkedett mindkét faj gyökércsúcsában, azonban egyértelmű tendenciát nehéz volna megállapítani, viszont jól látszik, hogy a szuperoxid gyökanion és SOD értékekhez hasonlóan az értékek jóval magasabbak *B. napus* esetén (22.A ábra).

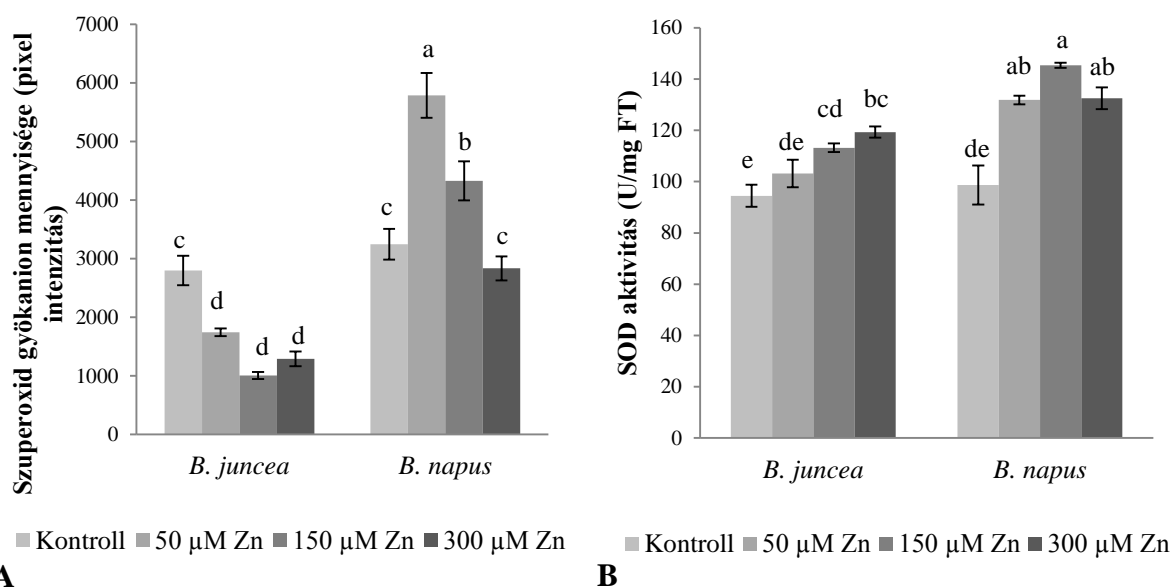
A sejtben keletkező hidrogén-peroxidot többek között az APX enzim képes semlegesíteni, ennek aktivitását szintén fotometriás módszerrel mértem. Mindkét fajban, a legalacsonyabb (10 μM) rézszulfát-kezelés nem szignifikáns módon megemelte, miközben a magasabb (25 és 50 μM) rézkezelések szignifikánsan csökkentették az APX aktivitást (22.B ábra). Az előzőekhez hasonlóan továbbá itt is látható, hogy a mért APX aktivitások általánosságban jóval magasabbak *B. napus* esetén, mint a *B. juncea* gyökereiben.



22. ábra: A hidrogén-peroxid mennyiségének (A) és az azt lebontó aszkorbát peroxidáz enzim aktivitásának (B) változása a rézkezelt *Brassica* gyökerekben. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján ($n=10$ és 6).

A réz ROF- és RNF-ra gyakorolt hatása mellett megvizsgáltam a cinkstressz hatását is azok homeosztázisára.

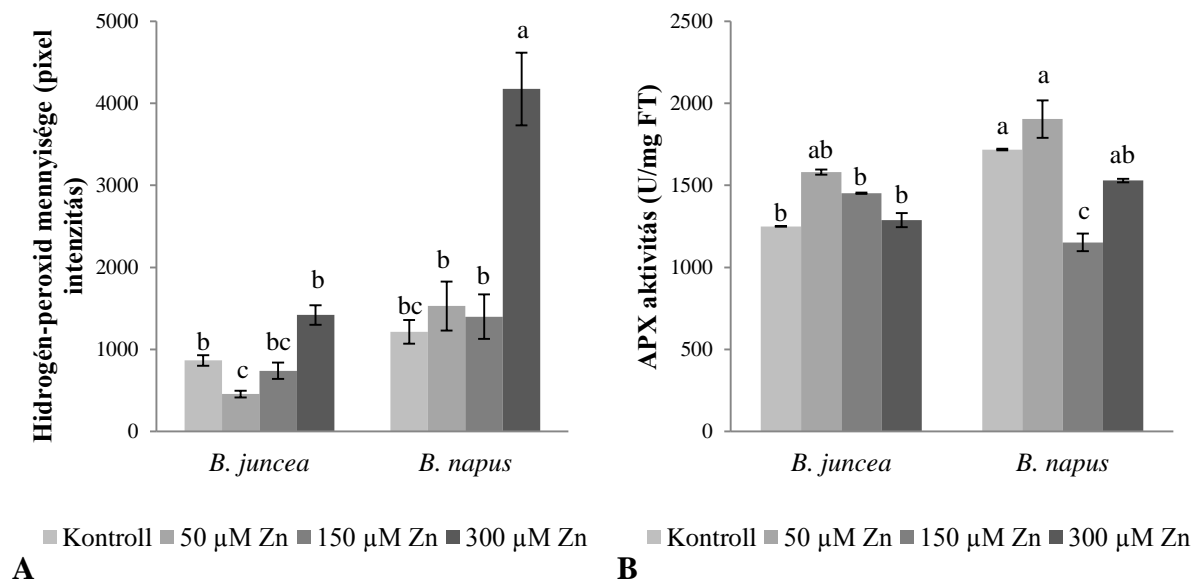
A szuperoxid gyök anion szintje szignifikánsan csökkent mindhárom alkalmazott cinkkezelés hatására a *B. juncea* gyökércsúcsaiban, míg ezzel szemben *B. napus* esetén az 50 és 150 μM cinkszulfát-kezelés szignifikáns növekedést váltott ki, a 300 μM pedig nem okozott jelentős eltérést a kontrollhoz képest (23.A és 28.A ábra).



23. ábra: A szuperoxid gyökanyon mennyiségének (A) és az azt lebontó szuperoxid dizmutáz enzim aktivitásának (B) változása a cinkkezelt *Brassica* gyökerekben. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján ($n=10$ és 6).

A SOD aktivitásának változása cinkstressznek kitett *B. juncea* gyökerekben koncentrációfüggő, szignifikáns emelkedést mutatott, ami magyarázhatja a szuperoxid gyökanyon szintjében tapasztalt csökkenő tendenciát. A SOD aktivitása szintén szignifikánsan megemelkedett *B. napus* gyökerekben is, ez azonban egyrészt nem függött az alkalmazott cinkkezelés erősségétől, másrészt pedig csupán a 300 µM cinkszulfát-kezelés esetében tudta a szuperoxid gyökanyon szintjét kontroll szintre csökkenteni (29.B ábra).

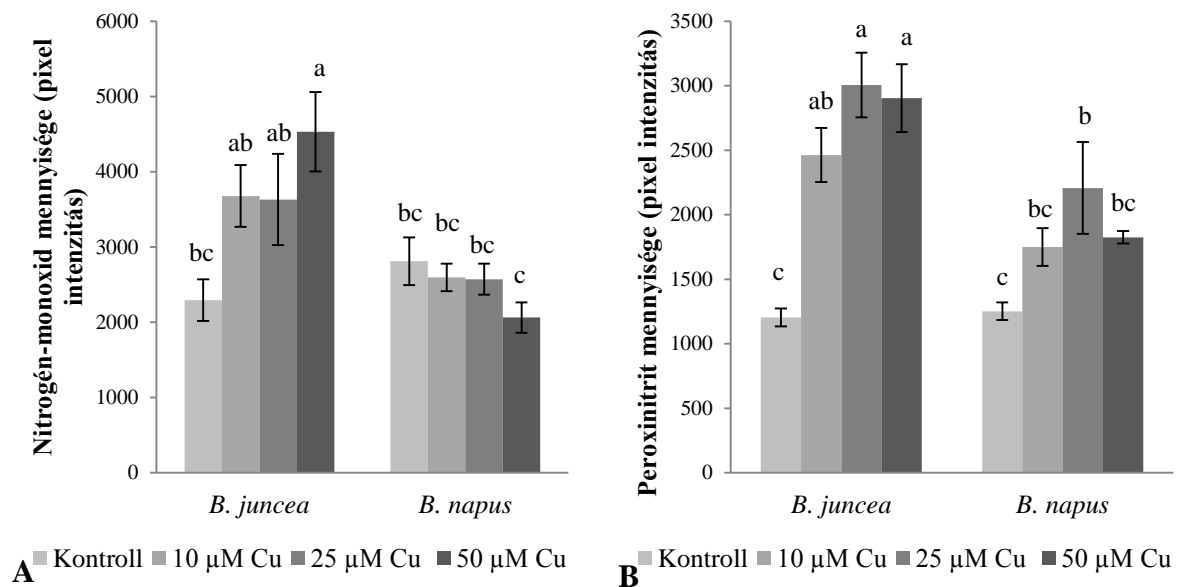
A hidrogén-peroxid mennyisége a *B. juncea* gyökércsúcsaiban a 300 µM cinkkezelést kivéve alacsonyan maradt. A *B. napus* esetén az alacsony (50 µM) és közepes (150 µM) koncentrációjú cinkkezelés csupán enyhén, míg a legmagasabb (300 µM) kiugró mennyiségű hidrogén-peroxid képződéséhez vezetett (24.A és 28.B ábra).



24. ábra: A hidrogén-peroxid mennyiségének (A) és az azt lebontó aszkorbát peroxidáz enzim aktivitásának (B) változása a cinkkezelt *Brassica* gyökerekben. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján ($n=10$ és 6).

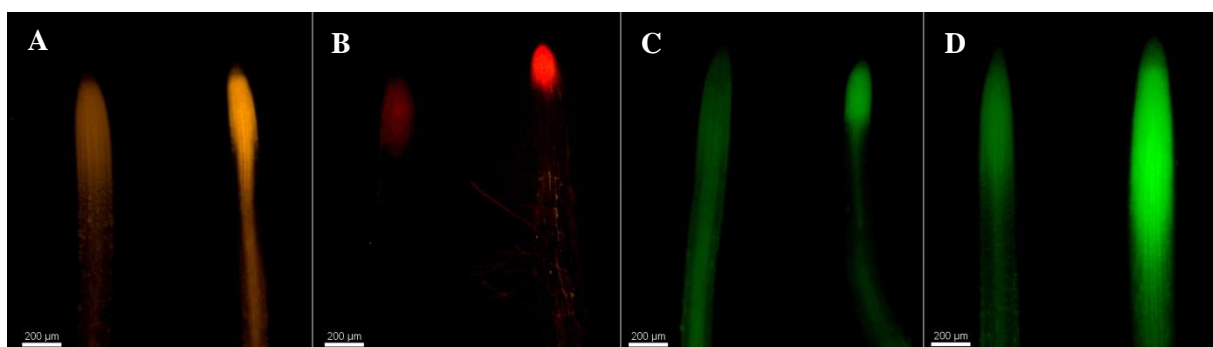
Az APX enzim aktivitása jól reflektál a hidrogén-peroxid szint változására a *B. juncea* gyökereiben, az 50 és 150 μ M cinkszulfát-kezelés által okozott enyhén magasabb APX aktivitás csökkenteni tudta a hidrogén-peroxid mennyiségét, míg a közel kontroll szintű APX aktivitás 300 μ M cinkkezelés esetén már nem volt elég a hidrogén-peroxid mennyiségének alacsonyan tartásához (24.B ábra). *B. napus* esetén a 150 és a 300 μ M cinkkezelés csökkentett az APX aktivitását, ami szerepet játszhat a már említett kiugró hidrogén-peroxid szintnek a 300 μ M cinkkezelés esetén.

A ROF mellett vizsgáltam a RNF mennyiségét is, ezek közül a legfontosabb a stressz hatására képződő NO, amit DAF-FM festéssel mutattam ki a gyökércsúcsokban (26.C ábra). Rézkitettség hatására szignifikánsan megemelkedett a gyökércsúcsok NO tartalma *B. juncea* esetében, miközben szintje kis mértékben csökkent a *B. napus* gyökereiben (25.A ábra).

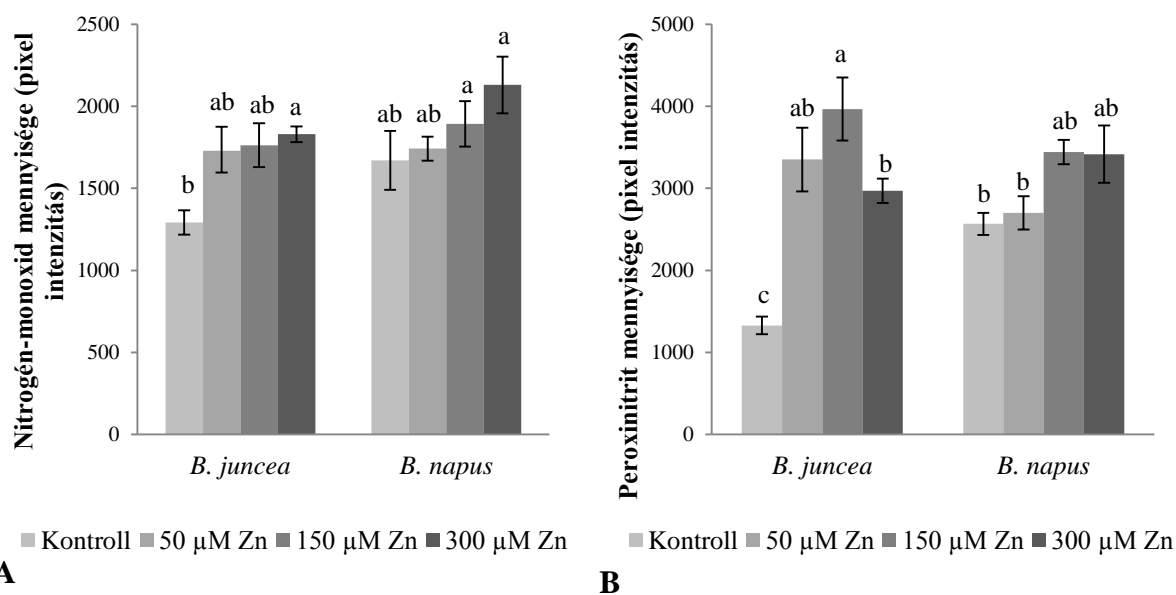


25. ábra: A nitrogén-monoxid (A) és az a peroxinitrit (B) mennyiségének változása a rézkezelte *Brassica* gyökércsúcsokban. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján ($n=10$).

Amennyiben azonos szövetekben lokalizálódik a NO valamint a szuperoxid gyökánion, peroxinitrit képződik, aminek mennyiségére 3'-(p-aminofenil) fluoreszcein festéssel következtettem (26.D ábra). *B. juncea* esetén a gyökércsúcsokban réz hatására szignifikánsan megemelkedik a peroxinitrit szintje (25.B ábra). A *B. napus* gyökércsúcsaiban szintén megnövekedett peroxinitrit-tartalmat tapasztaltam, itt a háttérben viszont az előzőhöz képest fordított a helyzet, a szuperoxid gyökánion szintje nőtt, miközben a NO szintje csökkent, azaz itt feltételezhetően a szuperoxid gyökánion szintjének erőteljes emelkedése felelős a megnövekedett peroxinitrit mennyiségért.



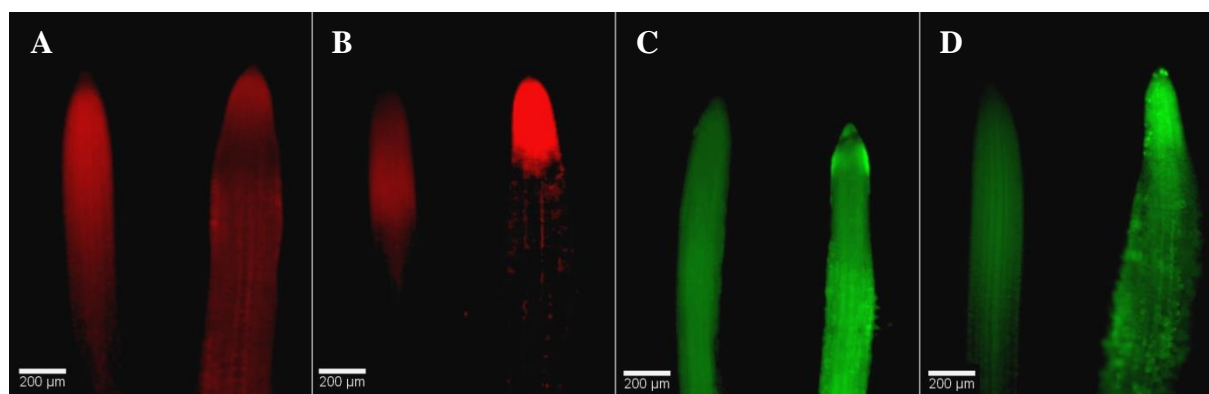
26. ábra: Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képek kontroll és 50 μM CuSO₄ kezelésnek kitett *Brassica* gyökércsúcsokról. A: *B. napus* – szuperoxid (DHE), B: *B. juncea* – hidrogén-peroxid (Amplex red), C: *B. juncea* – nitrogén-monoxid (DAF-FM DA), D: *B. juncea* – peroxinitrit (APF) (Mérce=0,2 mm).



27. ábra: A nitrogén-monoxid (A) és az a peroxinitrit (B) mennyiségének változása a rézkezelt *Brassica* gyökércsúcsokban. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján ($n=10$).

Cinkkezelés hatására a NO mennyisége mindkét vizsgált faj gyökércsúcsaiban, koncentrációfüggő módon megemelkedett, azonban statisztikailag ez csupán a *B. juncea* esetében volt szignifikáns (27.A és 28.C ábra).

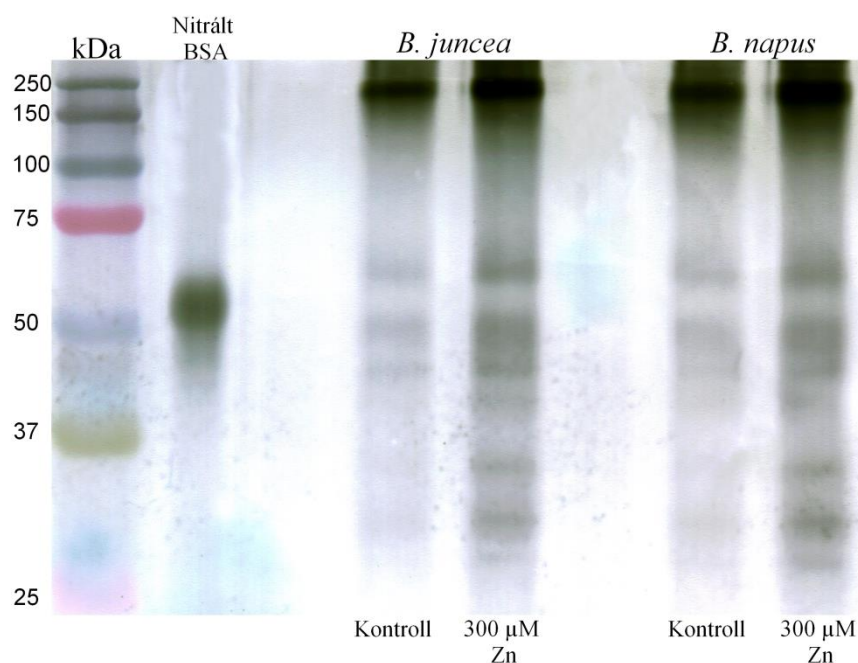
A NO és a szuperoxid gyökanionból kialakuló peroxinitrit szintje mindkét faj gyökércsúcsaiban emelkedést mutatott a cink kezelések hatására (27.B és 28.D ábra).



28. ábra: Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos képek kontroll és 300 µM $ZnSO_4$ kezelésnek kitett *Brassica* gyökércsúcsokról. A: *B. napus* – szuperoxid (DHE), B: *B. napus* – hidrogén-peroxid (Amplex red), C: *B. napus* – nitrogén-monoxid (DAF-FM DA), D: *B. napus* – peroxinitrit (APF) (Mérce=0,2 mm).

V.6.1. A cinkstressz tirozin nitrációt okoz a *Brassica* fajok gyökerében

A peroxinitrit szintjének emelkedése alapján feltételezhető volt, hogy történik fehérje tirozin nitráció, amit mint a nitrozatív stressz markerét előzetes immunoprecipitációval összekapcsolt western blot módszerrel mutattam ki a kontroll és 300 μ M cinkszulfát-kezelésnek kitett *Brassica* fajok gyökerében.



29. ábra: Reprezentatív immunoblot a fehérje tirozin nitráció kimutatására. A képen látható, hogy mind a *B. juncea*, mind a *B. napus* gyökereiben, kontroll és 300 μ M cinkszulfát-kezelés mellett nőtt növények gyökerében kimutatható volt fehérje tirozin nitráció. A kontroll mintákban tapasztalt gyenge jelhez képest cinkstressz hatására mindkét esetben emelkedett a tirozin nitráció mértéke, aminek mintázatában a két vizsgált faj között nem volt eltérés.

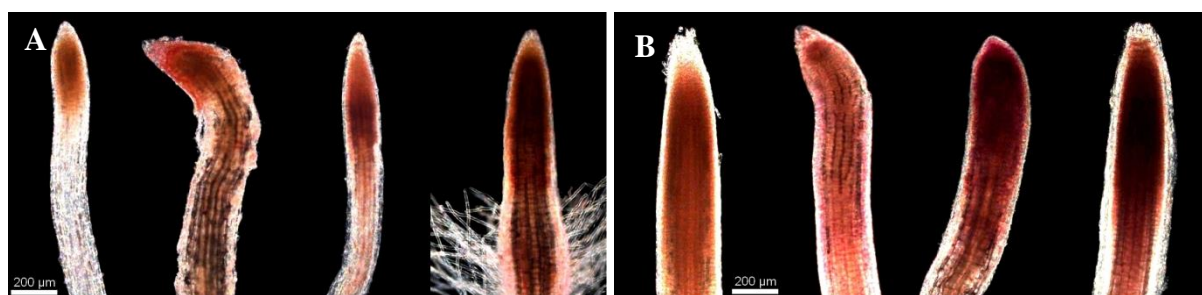
A 3-nitrotirozin elleni antitesttel végzett kísérletek eredménye alapján látható, hogy mindkét fajban mind a kontroll, mind a 300 μ M cinkkezelés mellett nőtt növények gyökerében történt fehérje tirozin nitráció, összesen nyolc fehérjesáv mutatott pozitív immunválaszt, 250, 60, 50, 45, 40, 35, 30 és 27 kDa-os méretben (29. ábra). A kontroll mintákban az immunopozitív sávok jóval halványabbak voltak, míg a cinkkezelt mintákban határozott erősödés volt tapasztalható. Ez arra utal, hogy a fehérjék egy része már kontroll körülmények között is bizonyos fokon nitrálódik, ez azonban cinkstressz hatására fokozódik. Az intenzifikáció mértéke mindkét vizsgált fajban jelentős volt, azaz mindkét faj proteomja érzékeny a nitrozatív módosításokra.

A rézstressznek kitett növények esetén már az előzetes kísérletek alapján látszott, hogy bár a peroxinitrit-értékek alapján lehetségesnek tűnt, a cinkkezeléssel szemben egyik alkalmazott rézkezelés sem okoz változást a fehérjék nitráltsági mintázatában vagy annak fokában, azaz a kontroll mintákban tapasztalt fehérje nitrációs szint nem emelkedett rézkezelés hatására, így ezzel a későbbiekben nem foglalkoztam részletesebben.

V.6.2. Az oxidatív stressz indikátora - lipidperoxidáció

A réz képes különféle szabad gyökök képződését indukálni, ezek, valamint a ROF homeosztázis egyensúlyának felborulása miatt felhalmozódó hidroxil gyök képesek lipid membránok peroxidatív károsítására, így a lipidperoxidáció vizsgálata az oxidatív stressz direkt indikátoraként alkalmazható.

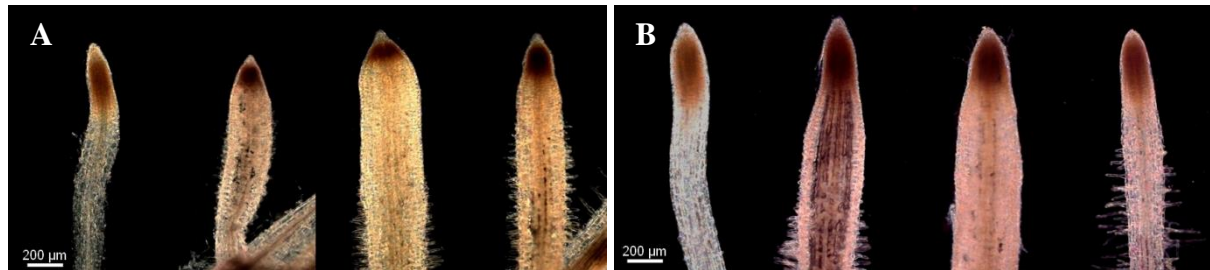
A Schiff-reagenssel végzett szövettani festés eredménye jól látható rózsaszín elszíneződéssel jelezte a lipidperoxidáció termékét, a malondialdehidet mindkét vizsgált fajban és mindhárom alkalmazott rézkoncentráció esetében (30. ábra). Bár a festés kvantitatív analízisre nem alkalmas, látható, hogy a festés intenzitása és kiterjedése a *B. napus* gyökereiben jelentősebb, azaz itt magasabb az oxidatív stressz mértéke, ami egybe vág a már bemutatott ROF mennyiségének alakulásával.



30. ábra: A lipidperoxidáció kimutatása rézkezelésnek kitett *B. juncea* (A) és *B. napus* (B) gyökércsúcsokban. Balról jobbra a kontroll, 10, 25 és 50 μM rézkezelés reprezentatív képei láthatók (Mérete=0,2 mm).

Ezzel szemben a cinkstressznek kitett *Brassica* növények gyökerei esetén azt tapasztaltam, hogy csupán a *B. napus* gyökereiben keletkezett rózsaszín színreakció, annak membránjai

erősen károsodtak az oxidatív stressz következtében, miközben a *B. juncea* esetén ez nem volt kimutatható (31. ábra).



31. ábra: A lipidperoxidáció kimutatása cinkkezelésnek kitett *B. juncea* (A) és *B. napus* (B) gyökérsúcsokban. Balról jobbra a kontroll, 50, 150 és 300 µM cinkkezelés reprezentatív képei láthatók (Mérce=0,2 mm).

VI. Eredmények értékelése

VI.1. Nehézfémfelvétel és transzlokáció

A rézzel és cinkkel kezelt növények elemtartalmának vizsgálata alapján mindkét általam alkalmazott nehézfémről megállapítható, hogy a vizsgált *Brassica* fajok jó hatásfokkal képesek azokat felvenni, azonban a növényen belül elsősorban a gyökérben akkumulálódnak. Az egyes nehézfémek felvételének és transzlokációjának volumenéről általánosan elmondható, hogy a két vizsgált faj egy nagyságrenddel több cinket vett fel a tápoldatból, mégis, ahogy a már bemutatott eredményekből látszik, megközelítőleg hasonló, sőt inkább enyhébb növekedési válaszokat produkáltak, mint a rézterhelésnek kitett társaik.

Mind a gyökér, mind a hajtás réztartalma korrelál a tápoldathoz hozzáadott réz mennyiségével. A két faj gyökerének rézakkumulációs képessége között nem mutatható ki érdemi különbség, ez alól kivételt képez a 10 μM rézsulfát-kezelés, ahol a *B. juncea* gyökerében 50 %-kal több réz halmozódott fel, mint a *B. napus* esetén (1. táblázat). A növények gyökérrendszere általánosságban mint védelmi vonal ismert nagy nehézfém-tartalmú közegekben, azok helyben tárolásával a növény képes a hajtás védelmére a nehézfém-stressz káros hatásaival szemben (Mazhoudi és mtsai, 1997). A növények hajtásába egy nagyságrenddel kevesebb réz transzlokálódott, és itt már szembetűnőbb különbség mutatkozott, a *B. juncea* majdnem kétszer annyi rézet transzportált a hajtásrendszerébe, mint a *B. napus* (2. táblázat). A tapasztalt, hatékonyan mondható réz-transzlokáció a hajtás irányába a xilém nyálábokon keresztül valószínűleg nikotinamid-komplexek formájában valósul meg (Burkhead és mtsai, 2009), azonban a hajtásba transzportált réz mennyisége alapján egyik vizsgált faj sem bizonyult réz-akkumuláló fajnak.

Mindkét általam vizsgált faj gyökerében a hozzáadott cink mennyiségével párhuzamosan nőtt a felvett cink mennyisége. A két *Brassica* faj gyökerének cinkfelvételi képességében csupán a 300 μM cinksulfát-kezelés után adódott különbség, itt a *B. juncea* mintegy 14%-kal több nehézfémet tárolt (3. táblázat). A gyökérben raktározódó cink elsősorban a sejtfalakban található meg, az epidermiszsejtek pedig fontos gátként funkcionálnak a cinknek a gyökér mélyebb régióiba jutása ellen. A hajtás tekintetében a cinkkezelés koncentrációfüggő növekedést eredményezett annak cinktartalmában, azonban a rézhez hasonlóan az itt mért értékek egy nagyságrenddel elmaradtak a gyökérben tapasztaltaktól. A *B. napus* esetén a hajtásba irányuló Zn-transzport hatékonyabbnak bizonyult, különösen az alkalmazott

legenyhébb és közepes erősségű cinkkezelés esetén (4. táblázat). Az eredmények mindkét fajban hatékony gyökér-hajtás transzportra utalnak, ami más fajokban, mint szójababban vagy paradicsomban elsődlegesen citrom- illetve almasavval alkotott komplexek formájában történik a xilémekben. Ezen kívül, cinkstressznek kitett növényekben kis mennyiségben oldható cink-foszfát szintén megtalálható a xilémnedvben is (White és mtsai, 1981). Kísérleti rendszeremben, mindkét, a korai növekedési stádiumban (9+7 nap) lévő faj cink-akkumulálónak bizonyult, mivel a hajtásrendszerükbe transzportált cink mennyisége meghaladta a hajtás száraz tömegének a 0,1%-át (300 μ M cinkszulfát-kezelés: *B. juncea*: 3211 μ g/g SZT; *B. napus*: 3727 μ g/g SZT). Hasonló cinkakkumulációs tendenciákat figyeltek meg korábban más, 12 napos, mérsékelten cinkakkumulálóként számon tartott *Brassica* fajok esetén (Ebbs és Kochian, 1997).

A gyökérben található cink elsődlegesen a merisztematikus zónában volt megtalálható, ami valószínűleg az itt található sejtek vékonyabb sejtfalainak nagyobb permeabilitásának köszönhető (8. ábra C és D). A Zinquin-1 fluoreszcencia szintén emelkedett *Solanum nigrum* gyökércsúcsaiban is, habár abban az esetben homogén eloszlást mutatott (Xu és mtsai, 2012). Habár az ICP-MS mérések alapján a két faj gyökerének cinktartalma között nem látszott lényegi különbség, a fluoreszcens jelölés alapján a *B. juncea* gyökércsúcsaiban nagyobb mennyiségű cink halmozódott fel. A cink-kapcsolt fluoreszcencia egyik alkalmazott festés és egyik faj esetében sem bizonyult koncentrációfüggőnek.

A sejtszintű cink-lokalizáció vizsgálata alapján a cink elsődlegesen a sejtfalakban halmozódott fel, emellett a gyökér felszínén lévő elhalt sejtek citoplazmájában és sejtmagjában is kimutatható volt (9. ábra), hasonlóan az irodalomban már korábban leírtakhoz (Rathore és mtsai, 1972). A gyökér belsőbb sejtrétegeiben, elsősorban a sejtek apoplasztikus terében halmozódott fel cink, és a legtöbb sejt életképes maradt, egyetértésben Küpper és mtsai (2000) eredményeivel. A sejtfal metabolikus inaktivitását a növények hasznukra fordítják a nehézfémek feltartóztatásában és kizárásában (Krzeslowska, 2011), ami elősegíti túlélésüket (Rout és Das, 2003).

VI.2. Nehézfém-indukált változások a mikroelemek homeosztázisában

A rézstressz számottevően befolyásolta a két vizsgált *Brassica* faj mikroelem-háztartását. A Zn, Fe és Mn koncentrációja szignifikánsan, de az alkalmazott rézkoncentráció erősségétől függetlenül csökkent mindkét vizsgált fajban (5. táblázat). A kialakuló vashiány a felvételnél kialakuló Cu-Fe kompetícióból eredeztethető antagonizmus eredménye (Lequeux és mtsai, 2010), ennek elsődleges tünete a levélerek között kialakuló klorózis (Taylor és Foy, 1985), ami mindkét faj levelein jól megfigyelhető volt. Szintén mindkét faj cinktartalmát negatívan befolyásolta a rézstressz, ennek hátterében az állhat, hogy megegyező transzporter-molekulákat, mint például cink-regulált transzporterek vagy vas-regulált transzporter-szerű fehérjéket (ZIP, Wintz és mtsai, 2003) használnak. A mangántartalom csökkentésében is szerepet játszik a réz, megváltoztatja annak felvételi hatékonyságát (Lidon és Henriques, 1993). Megemlítendő még, hogy előfordulhat a magas ionerősség miatt a tápoldatban kialakuló, például Cu-Zn antagonizmus is, ami szintén réz indukált cink- vagy vashiányhoz vezethet (Luo és Rimmer, 1995).

Hasonlóan a réztöbbletchez, a cinkkezelés hatására is jelentős változások történtek a gyökér mikroelem homeosztázisában (6. táblázat). Mindkét vizsgált faj gyökereiben megnövekedett a réz mennyisége. A jól ismert cink-réz antagonizmus hiányának hátterében feltételezésem szerint a két vegyértékű ionok közötti diszkrimináció állhat (Irving-Williams sorrend). A cink és a réz megegyező transzportereket használ, amik működése fokozódhat a megnövekedett külső cinkkoncentráció hatására, azonban az említett transzporterek a rézet előnyben részesítik a cinkkel szemben (Fraústo da Silva és Williams, 2001), ami végeredményben felelős lehet a tapasztalt növekedésért a cinkkezelt gyökerek réztartalmában. A rézhez hasonlóan a vas mennyisége is enyhe, ám szignifikáns emelkedést mutatott mindkét vizsgált faj gyökerében, miközben a cinkkezelés hatására minden esetben csökkent a mangán mennyisége. Hasonló változásokat tapasztaltak a vas és a mangán mennyiségének változásában *Arabidopsis thaliana* és *Thlapsi caerulescens* gyökerekben is (van de Mortel és mtsai, 2006), valamint a cinkkezelt *Lolium perenne* gyökerében mérhető mangán mennyisége szintén csökkenő tendenciát mutatott (Monnet és mtsai, 2006). A vas és cink között tapasztalt pozitív korreláció alapján feltételezhető, hogy a vizsgált növények fokozták a vasfelvételüket, hogy megakadályozzák a levelekben fellépő klorózist. Ezt az elképzelést támasztja alá, hogy *Arabidopsis* gyökerekben a cinkstressz számottevően fokozta a vas-kelát reduktáz gén

(FRO2) expresszióját, ami hozzájárulhat a vasszorbak fokozódásához (van de Mortel és mtsai, 2006).

VI.3. Nehézfém-indukált növekedési változások

A két alkalmazott nehézfém számos ponton befolyásolta a vizsgált *Brassica* fajok növekedését.

A hajtást vizsgálva a réz és a cink hatása hasonló, minden alkalmazott kezelés szignifikánsan csökkentette a hajtásrendszer méretét. A két nehézfém által kiváltott méretcsökkenés mértéke annak ellenére is azonos nagyságrendűnek bizonyult, hogy a cinkstressznek kitett növények esetén mind az alkalmazott külső koncentrációk (a hatás kiváltása végett, irodalmi adatok alapján kiválasztott), mind a növekedésük során a hajtásba transzlokált cinkmennyiség is magasabb volt, azaz a két *Brassica* faj toleránsabbnak bizonyult a cinkkel szemben (10. és 11. ábra).

A gyökérre kifejtett hatásuk alapján azonban a két fém eltérően hatott a két fajra. A réz mindkét *Brassica* faj gyökerének hossznövekedését szignifikánsan gátolta (12.A ábra), ezzel szemben az oldalgyökök számát jól láthatóan (viszont statisztikailag nem szignifikáns módon) emelte a 10 μ M rézszulfát-kezelés (14. ábra). A cink ezzel szemben csupán a *B. napus* főgyökerének növekedését gátolta, miközben a *B. juncea* főgyökerhosszát és friss tömegét nem csökkentette (13. ábra). Emellett a cinkstressz növekedést okozott az 50 és 150 μ M cinkszulfát-kezelésnek kitett növények oldalgyökér-számában (15. ábra).

Az enyhe réz- és cinkstressz mellett bekövetkező pozitív növekedési válasz segítheti a jobb tápanyag- és vízfelvételt, javítva a növény túlélési esélyeit nehézfém stressz során. Ez, a hajtás méretének csökkenésével segíthet fenntartani a növény megfelelő vízháztartását is. Hasonló réz-indukált morfogenetikai válaszokat (SIMV) mutattak ki *Arabidopsis* gyökerekben is (Kolbert és mtsai, 2012; Pasternak és mtsai, 2005), emellett nagyobb mennyiségű szelén, kadmium vagy cink is képes a koncentrációjától valamint időtartamától függően serkenteni az oldalgyökér-fejlődést (Lehotai és mtsai, 2012; Yang és mtsai, 2004).

Az eredmények alapján a sejtmegnyúlási és osztódási folyamatok a fő- és oldalgyökerekben jóval érzékenyebbek a réz- illetve cinkstresszre, mint az oldalgyökereket létrehozó antiklinális osztódási folyamatok a periciklusban. A cukornád főgyökök gyökércsúcsának mitotikus

indexét hasonlóan képes gátolni a cink, miközben számos más, citotoxikus hatással is rendelkezik (Jain és mtsai, 2010).

Az eredmények azt mutatják, hogy a cink a stressz a mértékétől függően képes megváltoztatni a gyökérarchitektúrát, emellett ez a hatás eltérőnek bizonyult a két faj esetén. Az enyhe (50 μM) cinkstressz mindössze a *B. napus* gyökérrendszerében váltotta ki a SIMV fenotípusának kialakulását (Potters és mtsai, 2009), ahol a főgyökér és oldalgyökerek hossza csökkent, míg az oldalgyökerek száma nőtt. Eközben a *B. juncea* oldalgyökér-fejlődése jelentősebben indukálódott, de a főgyökér hosszát nem befolyásolta a cinkstressz, ami a kontroll növényekhez képest egy kiterjedtebb gyökérrendszer kialakulásához vezetett a kezelt növényekben. Feltételezhető, hogy ezek a fejlődésbeli válaszok az akklimatizációs folyamat részei, amik hozzájárulnak a jobb tápanyag- és vízfelvételhez és így a *B. juncea* túléléséhez.

VI.4. A réz és a cink eltérő sejtfalmódosulásokat okoz a *Brassica* fajok gyökereiben

A különböző sejtfalmódosítások fontos védelmi funkciót töltenek be a nehézfémstressznek kitett növények gyökerében, mivel egyrészt a megerősített sejtfal fizikai gátként funkcionál a nehézfémek felvételének gátlásában, másrészt szükség esetén a növény képes azokat ott tárolni, anélkül hogy intracelluláris károkat okozna.

A gyökér sejtfalaiban a nehézfémek miatt bekövetkező vizsgálatok során eltérést tapasztaltam a réz és a cink által kifejtett hatásban. Rézstressz hatására hidrogén-peroxid termeléssel kolokalizált lignifikációt tapasztaltam az oldalgyökerek alapjánál (16. ábra). A lignifikáció számos enzimatis lépést magába foglaló folyamat, aminek befejező lépéséhez sejtfalhoz kapcsolt peroxidázok mellett hidrogén-peroxid jelenléte szükséges (Olson és Varner, 1993). A ligninberakódás a nehézfémfelvétel gátlása mellett valószínűleg hozzájárul a növekedésük gátlódásához, valamint a csökkent tápanyagfelvétel negatív hatással lehet a teljes növény növekedésére is (Schützendübel és Polle, 2002). Ezzel szemben a cinkstressz nem okozott észlelhető lignifikációt egyik vizsgált faj gyökérrendszerében sem.

A gyökér sejtfalaiba berakódó kallóz vizsgálata során fordított helyzet tapasztalható, azaz a réz csupán nagyon enyhe kallózfelhalmozódást volt képes indukálni, azt is csak a *B. napus* esetén (17. ábra). Ezzel szemben cink hatására mindkét vizsgált faj gyökércsúcsaiba jelentős mennyiségű kallóz rakódott be, ez a felhalmozódás különösen intenzívnek bizonyult a *B. napus* esetén (18. ábra). Hasonló, cink-indukált kallózzakkumulációt figyeltek meg bab

növényekben (Peterson és Rauser, 1979), ami a lignifikációhoz hasonlóan gátolhatja a gyökér növekedését a sejtfal fellazulás gátlása révén, valamint gátlódhat a jelmolekulák illetve a növekedéshez szükséges tápanyagok és sejtalkotó szénvegyületek mozgása (Jones és mtsai, 2006; Priselová és mtsai, 2012).

Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a két vizsgált sejtfalmódosulás kialakulása vagy elmaradása függ az alkalmazott nehézfém milyenségétől, viszont nem bizonyult fajfüggőnek a kísérleti rendszeremben.

VI.5. A réz és a cink eltérő mértékben csökkenti a gyökércsúcsi merisztéma életképességét

A gyökércsúcsi merisztémák életképességének vizsgálata a két nehézfém hatására több különbségre is fényt derített. Réz hatására mindkét faj gyökércsúcsának életképessége jelentősen csökkent, ez *B. napus* esetén volt igazán szembeötlő, ahol már a legalacsonyabb alkalmazott rézkezelés (10 μ M) is közel teljes életképesség-vesztést okozott (19. ábra). A réz-indukált sejthalál oka a redox-háztartás felborulása, valamint az oxidatív- és nitroztatív stressz lehet (Mullineaux és Baker, 2011; Corpas és mtsai, 2011). A merisztémák életképességének elvesztése emellett közvetlen szerepet játszik a gyökérmegnyúlás gátlásában.

Ezzel szemben a cinkkezelés szinte egyáltalán nem rontotta a *B. juncea* gyökércsúcsainak életképességét, és bár a *B. napus* esetén már szignifikáns csökkenést tapasztaltam, ez jelentősen enyhébbnek bizonyult, mint a rézkezelt növények esetében (20. ábra). Az eredmények alapján a merisztémák életképességi státusza és a főgyökerek hossza korrelációban van egymással, ez kiválóan látható a *B. juncea* esetén, ahol sem az életképesség, sem a főgyökerek hossza nem mutatott számottevő csökkenést, bizonyítva annak cinktoleranciáját és támogatva a cinktolerancia fajspecifikus voltát.

VI.6. Nehézfém-indukált változások a ROF és RNF metabolizmusában

A két nehézfém növekedésre, sejtfalmódosulásokra és a merisztémák életképességére kifejtett eltérő hatásai mögött többek között a redox egyensúly megváltozása állhat. A ROF és RNF, valamint az azok átalakításában és semlegesítésében részt vevő enzimatisz antioxiidánsok vizsgálata alapján megállapítható, hogy a két vizsgált *Brassica* faj alapvetően hasonlóan

reagál a réz- és cinkkezelésre, azonban a két nehézfém különböző hatással volt az oxidatív és nitroztatív stressz markereire, valamint a *B. juncea* gyökérnövekedésére.

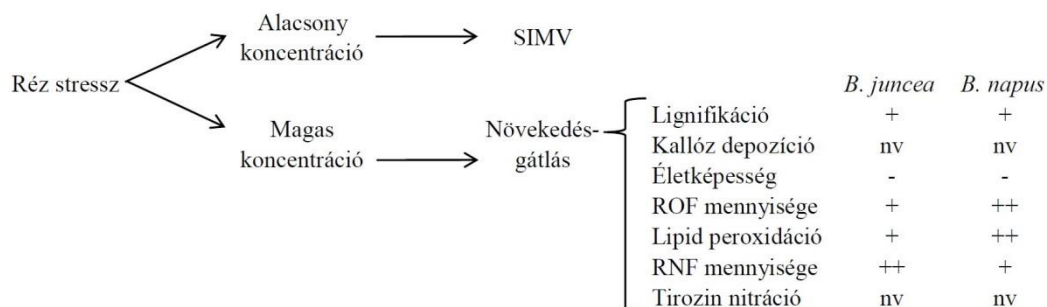
A rézstressz mindkét *Brassica* faj gyökérnövekedését erőteljesen gátolta, valamint a gyökércsúcsi merisztéma életképességét is közel nullára csökkentte (32. ábra). A növekedésgátlás hátterében a *B. napus* gyökerében erőteljesebb oxidatív stressz alakult ki, mint *B. juncea* esetén (21. ábra). A *B. napus* gyökércsúcsaiban rézstressz által indukált szuperoxid gyökanion képződéséért a különböző NADPH oxidázok lehetnek a felelősek (Opdenakker és mtsai, 2012); valamint hasonló, réz-indukált SOD aktivitást emelkedést tapasztaltak már mások is *B. juncea* gyökerekben (Singh és mtsai, 2010). A SOD intenzívebb működésének köszönhetően nőtt a hidrogén-peroxid mennyisége is a gyökércsúcsban, amihez csökkenő APX aktivitás társult, azaz a hidrogén-peroxid semlegesítése nem történt meg (22. ábra). Rézstressznek kitett tölgy növényekben szintén megfigyeltek APX aktivitás-csökkenést (Luna és mtsai, 1994).

Az oxidatív stressz jelenlétét alátámasztja a *B. napus* gyökerekben minden alkalmazott rézkoncentráció esetében tapasztalt erőteljes lipidperoxidáció is (30.B ábra). A lipidperoxidáció az oxidatív stressz egyik kiváló indikátora (Halliwell és Gutteridge, 1992; Corpas és mtsai, 2013). Ennek oka lehet egyrészt az APX aktivitásának csökkenése miatt nem lebontott hidrogén-peroxid továbbalakulása a lipidperoxidációért nagy részben felelős hidroxilgyökké, másrészt a réz közvetlenül képes oxigén gyökök (hidroxil, peroxil és alkoxil) képzésére, amik a tiolcsoportokhoz való kötődéssel peroxidatív károsodást okoznak a membránokon, így károsítják a sejt redox-állapotát (Dietz és mtsai, 1999).

A *B. juncea* csökkent gyökérnövekedése mögött alapvetően enyhébb mértékű oxidatív stresszt mutattam ki, a szuperoxid gyökanion mennyisége csökkent az emelkedő SOD aktivitásnak köszönhetően, és bár a hidrogén-peroxid mennyisége emelkedett, ez jóval kisebb mértékű volt, mint *B. napus* esetén; az ezt semlegesítő APX aktivitása rézkezelés hatására csökkenő tendenciát mutatott (21-22. ábra). Szintén kisebb mértékű oxidatív stresszre utal a lipidperoxidáció alacsonyabb mértéke is (30.A ábra).

Rézkezelés esetén bár *B. juncea*-ban a RNF közül a NO mennyisége enyhén megemelkedett, ezzel szemben a *B. napus* gyökércsúcsaiban mennyisége csökkenő tendenciát mutatott (25.A ábra). A réz-indukált NO több forrásból származhat, például a nitrát reduktáz aktivitásából, mint ahogy azt *Arabidopsis* gyökerében is kimutatták (Kolbert és mtsai, 2012); ezt támaszthatja alá a réz szerepe a nitrát reduktázhoz is szükséges molibdén-kofaktor szintézisében (Pilon és mtsai, 2006). Más esetben, például *Vicia faba* gyökércsúcsokban

viszont a NOS-szerű enzimaktivitás bizonyult felelősnek a réz-indukált NO termelődésért (Zou és mtsai, 2012). A peroxinitrit mennyisége bár mindkét vizsgált faj esetén szignifikánsan emelkedett (25.B ábra), a nitro-oxidatív stressz markereként számon tartott fehérje tirozin nitráció mértékében ez nem okozott változást.

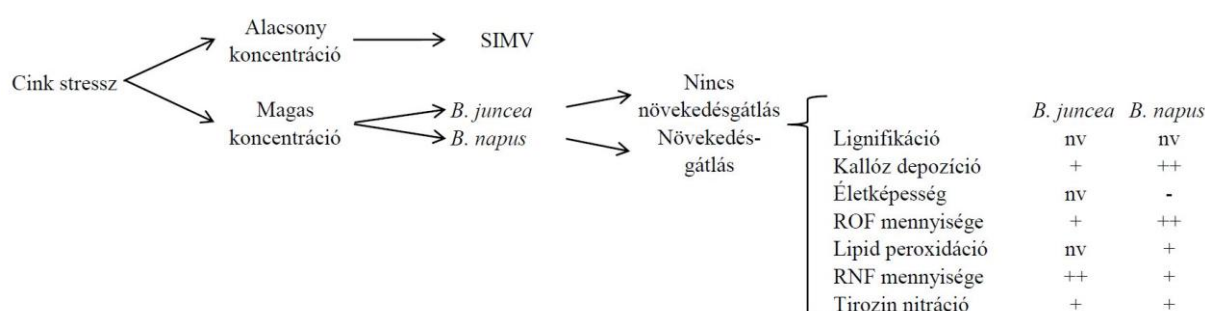


32. ábra: A rézstressz mindkét *Brassica* faj növekedését erőteljesen gátolta, valamint a gyökércsúcsi merisztéma életképességét is közel nullára csökkentette. A növekedésgátlás hátterében a *B. napus* gyökerében erőteljesebb oxidatív stressz alakult ki, mint *B. juncea* esetén, ezt alátámasztja a lipidperoxidáció intenzitása is. A RNF mennyisége bár mindkét vizsgált faj esetén szignifikánsan emelkedett, a nitro-oxidatív stressz markereként számon tartott fehérje tirozin nitráció mértékében ez nem okozott változást. (- = csökkenés, + = enyhébb növekedés, ++ = nagyobb mértékű növekedés, nv = nincs változás)

A cinkkezelés a rézkezeléshez hasonlóan jelentősen gátolta a *B. napus* gyökérnövekedését, habár megjegyzendő, hogy a gátlás mértéke enyhébbnek bizonyult, mint rézkezelés esetén (33. ábra). Ennek hátterében megemelkedett ROF képződést tapasztaltam. Korábban cink-indukált megemelkedett ROF képződést és az antioxidáns kapacitás megváltozását már számos növényben kimutatták, például cukornádban, babban, kukoricában, vagy épp borsóban (Chaoui és mtsai, 1997; Lozano-Rodríguez és mtsai, 1997; Jain és mtsai, 2010). A megemelkedett ROF képződés és az APX aktivitásának csökkenése összességében oxidatív stresszt okozott a gyökerekben (23-24. ábra), ezt a lipidperoxidáció jelenléte is alátámasztja (31.B ábra).

A RNF közül mind a NO, mind a peroxinitrit szintje megemelkedett cink hatására (27. ábra). A NO fő forrása a gyökérben a nitrát reduktáz, de ennek aktivitását a cinkstressz nem befolyásolta a *Brassica* gyökereiben (Bartha és mtsai, 2005). Emellett megfigyelték az átmeneti fémek által kiváltott GSNO bomlást, ami feltételezésem szerint NO felszabadulásához vezethet (Smith és Dasgupta, 2000) a cinkkezelt *Brassica* gyökerekben. A peroxinitrit mennyiségében jelentős emelkedés volt tapasztalható, ami fokozódó fehérje

tirozin nitrációhoz vezetett (29. ábra). A fehérjék kontroll állapotban is megfigyelhető nitráltságát már több növényben, mint például a napraforgóban, *Citrus*-ban vagy borsóban is bizonyították (Chaki és mtsai, 2009; Begara-Morales és mtsai, 2013; Corpas és mtsai, 2013). Saját eredményeimhez hasonlóan stressz hatására megnövekedő tirozin nitrációt megfigyeltek már só stressznek kitett olajfa levelekben hideg-kezelt borsó, illetve víz stressznek alávetett *Lotus japonicus* esetén (Valderrama és mtsai, 2006; Corpas és mtsai, 2008; Signorelli és mtsai, 2013). Esszenciális nehézfém által indukált fehérje tirozin nitrációt azonban elsőként csoportunk munkája révén sikerült kimutatni. A peroxinitrit konjugált sav köztes formán (ONOOH) keresztül, nitrogén-dioxiddá és hidroxilgyökké is képes alakulni, így a ROF megemelkedett mennyisége mellett szintén hozzájárulhat a csupán *B. napus* gyökereiben tapasztalt lipidperoxidáció kialakulásához. Mivel a *B. napus* esetén egy időben volt kimutatható oxidatív és nitrozatív stressz, így ebben az esetben nitro-oxidatív stressz kialakulásáról beszélhetünk.



33. ábra: A *B. juncea* gyökereiben a cinkkezelés nem okozott növekedésgátlást. A ROF mennyisége jóval alacsonyabbnak bizonyult, mint a gátolt gyökérnövekedésű *B. napus* esetén, ahol lipidperoxidáció, azaz oxidatív stressz is kimutatható volt. Az oxidatív stresszel ellentétben a nitrozatív stressz mértéke magasabbnak bizonyult, mint *B. napus* esetében, mind a NO, különösképp pedig a peroxinitrit mennyisége szignifikánsan megemelkedett, miközben a fehérje tirozin nitráció mértéke hasonló volt mindkét vizsgált fajban. (– = csökkenés, + = enyhébb növekedés, ++ = nagyobb mértékű növekedés, nv = nincs változás)

A *B. juncea* gyökereiben a cinkkezelés nem okozott növekedésgátlást (33. ábra). Az oxidatív stressz elemeinek vizsgálata során kiderült, hogy az jóval gyengébbnek bizonyult, mint *B. napus* esetén, a megemelkedő SOD aktivitás alacsonyan tartotta a szuperoxid gyökánion mennyiségét, valamint az emelkedő APX aktivitás alacsonyabb szinten tudta tartani a hidrogén-peroxid mennyiségét is (23-24. ábra). A fentiekkel egyetértésben lipidperoxidációt nem tudtam kimutatni a gyökércsúcsokban (31.A ábra). Az oxidatív stresszel ellentétben a nitrozatív stressz mértéke magasabbnak bizonyult, mint *B. napus* esetében, mind a NO,

különösképp pedig a peroxinitrit mennyisége szignifikánsan megemelkedett (27. ábra), habár a fehérje tirozin nitráció hasonló mértékű volt, mint a *B. napus* gyökereiben (29. ábra).

Az eredményeket összefoglalva elmondható, hogy mindkét faj képes volt életben maradni magas réz- és cinkkoncentrációk mellett, ráadásul képesek voltak a nehézfémek felvételére is a gyökérükbe, habár a legtöbb esetben ez súlyos növekedésgátlást okozott. Ez alól kivételt képez a cinkkezelésnek kitett *B. juncea*, ahol sem a gyökércsúcsi merisztéma életképessége, sem a gyökérrendszer növekedése nem szenvedett el gátlást. Összességében tehát mindkét általam vizsgált faj mérsékelten réz és cink toleránsnak nevezhető ebben a fiatal életkorukban is. Ennek hátterében különböző szerv- és sejtszintű toleranciamechanizmusok állnak. Jellemző egyrészt a nehézfémek kizárása a hajtásból a transzlokáció minimalizálásával, másrészt pedig a gyökérzet morfológiai adaptációja alacsony koncentrációjú fémkitettség esetén, a jobb víz- és tápanyagfelvétel, azaz a túlélés érdekében. Sejtszinten a gyökér sejtjei igyekeznek kizárni a két vizsgált nehézfémet a citoplazmájukból, ezt rézstressz esetén lignifikáció, míg cinkstressz esetén kallózberakódás segíti, emellett cinkkezelés esetén kimutattam annak megkötését a sejtfalban is.

Bár a két fém által *B. juncea* gyökereiben okozott változások a ROF és RNF mennyiségében hasonló tendenciát mutattak, fontos különbség, hogy cink hatására nem alakul ki lipidperoxidáció, azaz oxidatív stressz. Ezzel szemben minden egyéb esetben (rézstressz hatására mindkét fajban, valamint cinkstressz alatt *B. napus* esetén) megfigyelhető valamilyen mértékű lipidperoxidáció, és így oxidatív stressz, ez pedig a gyökérnövekedés gátlásával párosul. A RNF mennyiségének változása alapvetően fajspecifikusnak bizonyult (*B. juncea* esetén erősebb, míg *B. napus* esetén gyengébb emelkedés); ez rézstressz hatására nem okozta a fehérje tirozin nitráció fokozódását, miközben cink hatására mindkét fajban jelentős emelkedést tapasztaltam.

Az eredmények alapján az is feltételezhető, hogy a két faj réz- és cink-érzékenysége inkább függ az oxidatív stressz mértékétől illetve meglététől, mint a nitrozatív stressz folyamatokétól, ennek oka pedig az lehet, hogy az oxidatív stressz szélesebb körű, több makromolekulát érint, míg a nitrozatív stressz kevesebbet.

VII. Összefoglalás

Ph.D. munkám során a réz és a cink hatását hasonlítottam össze két, gazdaságilag nagy jelentőséggel bíró haszonnövényben, *Brassica juncea*-ban és *Brassica napus*-ban. Kutatásaim során e két faj nehézfémstresszre adott válaszait vizsgáltam morfológiai, biokémiai és molekuláris szinten. Elvégeztem a nehézfémstressznek kitett növények fémfelvételének és mikroelem-háztartásának vizsgálatát, tanulmányoztam a stressz-indukált morfogenetikai válaszok kialakulását, az ezek hátterében húzódó egyes folyamatokat, mint a sejtfalmódosulásokat, az életképesség változását és a ROF és RNF metabolizmusában bekövetkezett változásokat, azok viszonyát.

A munkám során kapott eredményeim alapján megállapítható, hogy:

1. A rézzel és cinkkel kezelt növények elemtartalmának vizsgálata alapján mindkét nehézfémre igaz, hogy a vizsgált fajok jó hatásfokkal képesek azokat felvenni, emellett ezek a gyökérben akkumulálódnak. A hajtásba történő transzportról elmondható, hogy a cink egy nagyságrenddel nagyobb mennyiségben transzlokálódott a fajok hajtásaiba, mint a réz; valamint mind a réz-, mind a cinkkezelés megzavarta a két vizsgált faj gyökereinek Cu/Zn, Fe és Mn-háztartását.
2. A legalacsonyabb koncentrációjú alkalmazott rézkezelés mindkét faj esetén, míg a legenyhébb cinkkezelés csak a *B. napus* esetén váltotta ki a stressz-indukált morfogenetikai válasz összes tünetének megjelenését. Ezen kívül megállapítható, hogy a rézstresszre mindkét faj, míg cinkstresszre csak a *B. napus* gyökérrendszerének növekedése bizonyult érzékenynek.
3. A réz és a cink eltérő sejtfalmódosulásokat okozott a két vizsgált faj gyökereiben. A rézstressz ligninberakódást indukált az oldalgyökerek eredési zónájában, ami hidrogén-peroxid- asszociáltnak bizonyult, miközben cink hatására nagy mennyiségű kallóz adódott a gyökércsúcsokat alkotó sejtek sejtfalaihoz. A gyökércsúcsi merisztéma életképességének vizsgálata alapján elmondható, hogy a réz és a cink eltérő mértékben csökkenti azok életképességét. Réz hatására ez mindkét faj esetében jelentősen csökkent, míg a cinkstressz nem befolyásolta érdemben a *B. juncea*

gyökércsúcsainak életképességét, és a *B. napus* esetén tapasztalt csökkenés is jóval enyhébbnek bizonyult, mint amit rézstressz esetén tapasztaltam.

4. Eredményeim fényt derítettek a réz- és a cinkstressz hatására bekövetkező változásokra a ROF és RNF homeosztázisában. Réz hatására a gyökércsúcsokban található NO mennyisége *B. juncea* esetén enyhén megemelkedett, míg *B. napus* esetén csökkent, és bár a peroxinitrit mennyisége mindkét faj esetén szignifikánsan emelkedett, a fehérje tirozin nitráció mértékében nem tapasztaltam emelkedést, azaz a nagymértékű oxidatív stressz jelenléte ellenére nem beszélhetünk nitro-oxidatív stresszről.

Ezzel szemben cink hatására mindkét vizsgált faj gyökerében megemelkedett mind a NO mind a peroxinitrit mennyisége, és bennük tapasztalható oxidatív stressz eltérő mértéke ellenére mindkét esetben fokozódott a fehérje tirozin nitráció mértéke.

5. Kutatásaim alapján elmondható, hogy az oxidatív stressz meghatározó szerepet játszik a két vizsgált *Brassica* faj nehézfém-érzékenységében. Ahol nem alakult ki oxidatív stressz, ott a gyökér növekedésének gátlása elmaradt, azaz a növény jobban tolerálta a nehézfémstresszt (jelen esetben a *B. juncea* a cinkstresszt). Az eredmények alapján az is feltételezhető, hogy a két faj réz- és cink-érzékenysége inkább függ az oxidatív stressz mértékétől illetve meglététől, mint a nitroztív stressz folyamatokétól.

A kutatásaim során elért eredményekből jól látszik, hogy a nehézfémstressz hatására bekövetkező morfológiai változások mögött szerteágazó változások állnak, kezdve az elemtartalom megváltozásától egészen a nitroztív valamint oxidatív stressz kialakulásáig.

Véleményem szerint az elvégzett kísérleti munkámmal hozzá tudtam járulni az abiotikus stressz (nehézfém stressz) hatására kialakuló nitro-oxidatív stressz összefüggéseinek jobb megismeréséhez.

VIII. Summary

During my Ph.D. studies, I compared the effect of copper and zinc on two economically important plant crop species: *Brassica juncea* and *Brassica napus*. I investigated their responses to heavy metal stress by analysis of changes in their morphology, biochemistry and molecular levels. I performed the investigation of the two species' heavy metal uptake and changes in their microelement homeostasis. Furthermore, I studied the stress-induced morphogenetic responses, as well as the underlying background processes such as changes in the cell walls, loss of root apical meristem viability, changes in the levels of reactive oxygen and nitrogen species and their interconnections.

Based on my results, I can summarise:

1. According to the element content analysis of the two species grown in excess copper or zinc, it can be stated that the two species have demonstrable metal uptake capacity, accumulating the two metals primarily in their root systems. The root-to-shoot transport is more effective with that of zinc than that of copper stress: the plants translocate zinc in an order of magnitude better into their leaves. Both copper and zinc stress caused alterations in the Cu/Zn, Fe and Mn homeostasis in the roots of the two investigated species.
2. The lowest applied copper treatment caused the development of the symptoms of stress-induced morphogenetic responses in both species, while the lowest zinc treatment caused a similar effect only on *B. napus*. It was also found that the root growth of both species is sensitive to copper stress, while only the root growth of *B. napus* proved to be sensitive to excess zinc.
3. The copper and zinc resulted in different cell wall alterations in the roots of the two species. Copper caused lignin formation at the base of the lateral roots, which was proved to be hydrogen peroxide-dependent, while zinc resulted in callose deposition in the cell walls of the root tips. The two applied heavy metals affected the viability of the root apical meristems in different ways. Copper caused significant viability-loss in both species, while zinc excess did not affect the viability of the root tips of *B. juncea*.

Moreover, the decrease in viability experienced in *B. napus* was significantly smaller than in case of copper excess.

4. My results highlighted the copper- and zinc-induced changes in the homeostasis of the reactive oxygen and nitrogen species. Copper caused a slight increase in the NO content of *B. juncea* root tips, whereas the levels decreased in the case of *B. napus*. Moreover, while the peroxynitrite level in both species' root tips increased significantly, increase in the protein tyrosine nitration was undetectable. Therefore, despite the strong oxidative stress, no comment can be made regarding nitro-oxidative stress.

Conversely, zinc increased both the NO and peroxynitrite levels of both species' root tips, and despite the different level of oxidative stress detected, protein tyrosine nitration increased in both species.

5. According to my results, oxidative stress plays a predominant role in the heavy metal sensitivity of the two *Brassica* species. Where oxidative stress was undetectable, the growth of the root was not inhibited, thus the plant tolerated heavy metal stress better (in this case *B. juncea* zinc excess). The results also suggest that the sensitivity of the two species to copper or zinc stress is determined by the level of oxidative stress, rather than by the nitrosative stress processes.

Based on the results obtained during my research, it is clear that behind the morphological changes due to heavy metal stress there is a complicated network of changes, from the alterations in the element content to the development of nitrosative and oxidative stress.

In my opinion, with the work that I have done, I have contributed to the better understanding of the development of nitro-oxidative stress due to abiotic (heavy metal) stress.

IX. Irodalomjegyzék

- Abello N, Kerstjens HA, Postma DS, Bischoff R (2009) Protein tyrosine nitration: Selectivity, Physiochemical and biological consequences, dentiration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *J. Proteome Res.* 8:3222-3238.
- Adler E, Bjorkqvist KJ, Haggroth S (1948) Uber die ursache der farbreaktionen des holzes. *Acta Chem. Scand.* 2:93-94.
- Agrawal GK, Jwa N-S, Agrawal SK, Tamogami S, Iwahashi H, Rakwal R (2003b) Cloning of novel rice allene oxide cyclase (OsAOC): mRNA expression and comparative analysis with allene oxide synthase (OsAOS) gene provide insight into the transcriptional regulation of octadecanoid pathway biosynthetic genes in rice. *Plant Sci.* 164:979–992.
- Airaki M, Leterrier M, Mateos RM, Valderrama R, Chaki M, Barroso JB, del Río LA, Palma JM, Corpas FJ (2012) Metabolsim of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant Cell Environ.* 35:281-295.
- Airaki M, Sánchez-Moreno L, Leterrier M, Barroso JB, Palma JM, Corpas FJ (2011) Detection and quantification of S-nitrosogluthathione (GSNO) in pepper (*Capsicum annuum* L.) plant organs by LC-ES/MS. *Plant Cell Phys.* 52:2006-2015.
- Alamillo JM, García-Olmedo F (2001) Effects of urate, a natural inhibitor of peroxynitrite-mediated toxicity, in the response of *Arabidopsis thaliana* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant J.* 25:529-540.
- Allan AC, Fluhr R (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 9:1559-1572.
- Alscher RG, Donahue JH, Cramer CL (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol. Plantarum* 100:224-233.
- Alvarez ME, Lamb C (1997) Oxidative burst-mediated defense responses in plant disease resistance. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Scandalios JG (Ed.), 815-839, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Andreini C, Bertini I (2009) Metalloproteomes: a bioinformatic approach. *Acc Chem Res* 42:1471–1479.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:373-399.
- Apostol I, Heinsteins PF, Low PS (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiol.* 90:106-116.
- Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Kubis J (2009) Involvement of nitric oxide in water stress-induced responses of cucumber roots. *Plant Sci.* 177:682-690.

- Arduini I, Masoni A, Mariotti M, Ercoli L (2004) Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. *Environ. Exp. Bot.* 52:89-100
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 50:601-639
- Astier J, Lindermayr C (2012) Nitric oxide-dependent posttranslational modifications in plants: an update. *Int. J. Mol. Sci.* 13:15193-15208.
- Bai X, Yang L, Yang Y, Ahmad P, Yang Y, Hu X (2011) Deciphering the protective role of nitric oxide against salt stress at the physiological and proteomic levels in maize. *J. Proteome Res.* 10:4349-4364.
- Baker AJM (1978) Ecophysiological aspects of zinc tolerance in *Silene maritima*. *New Phytol.* 80:635-642.
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Rodríguez-Serrano M, Esteban FJ, Fernández-Ocana A, Chaki M, Romero-Puertas MC, Valderrama R, Sandalio LM, del Río LA (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J. Exp. Bot.* 57:1785-1793.
- Bartha B, Kolbert Zs, Erdei L (2005) Nitric oxide production induced by heavy metals in *Brassica juncea* L. Czern. and *Pisum sativum* L. *Acta Biol. Szegediensis* 49:9-12.
- Bayden AS, Yakovlev VA, Graves PR, Mikkelsen RB, Kellogg GE (2011) Factors influencing protein tyrosine nitration – structure-based predictive models. *Free Radic. Biol. Med.* 50:749-762.
- Begara-Morales JC, Chaki M, Sánchez-Calvo B, Mata-Pérez C, Leterrier M, Palma JM, Barroso JB, Corpas FJ (2013) Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence. *J. Exp. Bot.* 64:1121-1134.
- Beligni MV, Lamattina L (1999) Is nitric oxide toxic or protective? *Trends Plant Sci.* 4:299-300.
- Beligni MV, Lamattina L (1999) Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta* 208:337-344.
- Beligni MV, Lamattina L (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environ.* 24:267-278.
- Beligni MV, Lamattina L (2002) Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant Cell Environ.* 25:737-748.
- Bellin D, Asai S, Delledonne M, Yoshioka H (2013) Nitric oxide as a mediator for defense responses. (*MPMI*) *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26 (3): 271-277.
- Bernal M, Ramiro MV, Cases R, Picorel R, Yruela I (2006) Excess copper effect on growth, chloroplast ultrastructure, oxygen-evolution activity and chlorophyll fluorescence in *Glycine max* cell suspensions. *Physiol. Plantar.* 127:312-325
- Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, Taconnat L, Renou JP, Pugin A, Wendehenne D (2009) Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis*

by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiol.* 149:1302-1315.

Bienert GP, Moller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Möller IM, Schjoerring JK, Jahn TP (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* 282:1183-1192.

Bjerre GK, Schierup HH (1985) Uptake of six heavy metals by oak as influenced by soil type and additions of cadmium, zinc, lead and copper. *Plant Soil* 88:57-69.

Böddi B, Oravecz AR, Lehoczki E (1995) Effect of cadmium on organization and photoreduction of protochlorophyllide in dark-grow leaves and etioplast inner membrane preparations of wheat. *Photosynthetica* 31:411-420.

Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR és mtsai (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* 53:1367-1376.

Bolwell GP, Davies DR, Gerrish C, Auh CK, Murphy TM (1998) Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiol.* 116:1379-1385.

Briat JF, Lebrun M (1999) Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 322:43-54.

Broniowska KA, Diers AR, Hogg N (2013) S-Nitrosoglutathione. *Biochim. Biophys. Acta* 1830:3173-3181.

Burkhead JL, Reynolds KAG, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M (2009) Copper homeostasis. *New Phytol.* 182:799-816.

Cadenas E (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58:79-110.

Cakmak I, Marschner H (1993) Effect of zinc nutritional status on superoxide radical and hydrogen peroxide scavenging enzymes in bean leaves. Barrow NJ (Ed.) *Plant nutrition-from genetic engineering field practice*, 133-137, Kluwer

Cao P, Sun J, Zhao P, Liu H, Zheng G (2011) A new putative plasmodesmata protein, At1g19190 in *Arabidopsis*. *Afr. J. Biotech.* 10:17409-17423.

Capone R, Tiwari BS, Levine A (2004) Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* 42:425-428.

Carillo-González R, Simunek J, Savué S, Adriano D (2006) Mechanisms and pathways of trace element mobility in soils. *Adv. Agron.* 91:113-180

Cecconi D, Orzetti S, Vandelle E, Rinalducci S, Zolla L, Delledonne M (2009) Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* 30:2460-2468.

Chaki M, Fernández-Ocana AM, Valderrama R, Carreras A, Esteban FJ, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Beraga-Morales JC, Corpas FJ, Barroso JB (2009) Involvement of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in sunflower-mildew interaction. *Plant Cell Phys.* 50:265-279.

- Chaki M, Valderrama R, Fernández-Ocana A, Carreras A, Góme-Rodríguez MV, Pedjaras JR, Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Luque F, Leterrier M, Corpas FJ, Barroso JB (2011) Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *J. Exp. Bot.* 62:1803-1813.
- Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal MN, Ferjani EE (1997) Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzymes activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* 127:139–147.
- Clemens S (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 309:151-160
- Colangelo EP, Guerinot ML (2006) Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:322–330.
- Corpas FJ, Barroso JB (2013) Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New Phytol.* 199:633-635.
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, del Río LA (2006) Nitrosative stress in plants: a new approach to understand the role of NO in abiotic stress. *Nitric Oxide in Plant Growth, Development and Stress Physiology*, Lamattina L, Polacco JC (Ed.), 187-205, Springer-Verlag.
- Corpas FJ, Carreras A, Valderrama R, Chaki M, Palma JM, del Río LA, Barroso JB (2007) Reactive nitrogen species and nitrosative stress in plants. *Plant Stress* 1:37-41.
- Corpas FJ, Chaki M, Fernandez-Ocana A, Valderrama R, Palma JM, Carreras A, Begara-Morales JC, Airaki M, del Río LA, Barroso JB (2008) Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant Cell Phys.* 49:1711-1722.
- Corpas FJ, del Río LA, Barroso JB (2007b) Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends Plant Sci.* 12:604-611.
- Corpas FJ, Palma JM, del Río LA, Barroso JB (2009) Evidence supporting the existence of l-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phyt.* 184:9-14.
- Corpas FJ, Palma JM, del Río LA, Barroso JB (2013) Protein tyrosine nitration in higher plants grown under natural and stress conditions. *Front. Plant Sci.* 4: article nu. 29.
- Correa-Aragunde N, Lombardo C, Lamattina L (2008) Nitric oxide: an active nitrogen molecule that modulates cellulose synthesis in tomato roots. *New Phytol.* 179:386-396.
- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:850-861.
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:13454-13459.
- Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P, Thorpe TA (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32:93-101.

- Dietz KJ, Baier M, Krämer U (1999) Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. *Heavy metal stress in plants*, Prasad MNV, Hagemeyer J (Ed.), 73-97, Springer-Verlag.
- Dietz KJ, Jacob S, Oelze ML, Laxa M, Tognetti V, de Miranda SMN, Baier M, Finkemeier I (2006) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J. Exp. Bot.* 57:1697-1709.
- Doke N (1985) NADPH-dependent O_2^- generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* 27:311-322.
- Doke N (1997) The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, Scandalios JG (Ed.), 785-813, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ebbs SD, Kochian LV (1997) Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: implications for phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 26:776-781.
- Ederli L, Reale L, Ferranti F, Pasqualini S (2004) Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. *Physiol. Plant.* 121:66-74.
- Elstner EF (1991) Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. *Active oxygen/oxidative stress in plant metabolism*, Pelland EJ és Steffen KL (Ed.), 13-25, Rockville.
- Enyedi AJ, Yalpani N, Silverman P, Raskin I (1992) Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* 70:879–886.
- Epstein E, Bloom AJ (2005) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives, 2nd edn. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc.
- Ernst WHO, Verkleij JAC, Schat H (1992) Metal tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.* 41:229-248.
- Espunya MC, De Michele R, Gómez-Cadenas A, Martínez MC (2012) S-Nitrosoglutathione is a component of wound- and salicylic acid-induced systemic responses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 63:3219-3227.
- Feechan A, Kwon E, Yun BW, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 102:8054-8059.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownelee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422:442–446.
- Foresi N, Crea-Aragunde N, Parisi G, Caló G, Salerno G, Lamattina L (2010) Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *The Plant Cell* 22:3816-3830.

- Foyer CH, Halliwell B (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133:21-25.
- Foyer CH, Harbinson JC (1994) Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*, Foyer CH és Mullineaux PM (Ed.), 1-42, Boca Raton.
- Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.* 119:355–364.
- Foyer CH, Noctor G (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 28:1056-1071.
- Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant. Phys.* 155:55-64.
- Fraústo da Silva JJR, Williams RJP (2001) The biological chemistry of the elements. 2. kiadás, Oxford: Clarendon Press.
- Freschi L (2013) Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *frontiers in Plant Science* 4:398 doi: 10.3389/fpls.2013.00398.
- Gabaldón C, Gómez Ros LV, Pedreno MA, Ros Barceló A (2005) Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytol.* 165:121-130.
- Garnier L, Simon-Plas F, Thuleau P, Agnel JP, Blein JP, Ranjeva R, Montillet JL (2006) Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant Cell Environ.* 29:1956-1969.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Phys and Biochem* 48:909-930.
- Giustarini D, Milzani A, Aldini G, Carini M, Rossi R, Dalle-Donne I (2005) S-nitrosation versus S-glutathionylation of protein sulphhydryl groups by S-nitrosoglutathione. *Antiox. Redox. Signal.* 7:930-939.
- Gopalakrishna R, Chen ZH, Gundimeda U (1993) Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J. Biol. Chem.* 268:27180-27185.
- Goretski J, Hollocher TC (1988) Trapping of nitric oxide produced during denitrification by extracellular hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 263:2316-2323.
- Gunther MR, Sturgeon BE, Mason RP (2002) Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical-chemistry and biochemistry. *Toxicology* 177:1-9.
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT (2011) On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* 16 (3):160-198.
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Phys*, 141:312–322.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219:1–14

- Halliwell B, Gutteridge JMC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals, and disease. *Biochem J.* 219:1-14.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) Free radicals in biology and medicine, 2. kiadás, Oxford: Clarendon.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation – an update. *FEBS. Lett.* 307:108-112.
- Hasnain S, Sabri AN (1997) Growth stimulation of *Triticum aestivum* seedlings under Cr-stresses by non-rhizospheric pseudomonad strains. *Environ. Pollut.* 97:265-273.
- Herstein U, Jager HJ (1986) Tolerances of different populations of three grass species to cadmium and other metals. *Environ. Exp. Bot.* 26: 309-319.
- Hewitt EJ (1983) Metals and micronutrients: uptake and utilisation by plants. Robb D.A., Pierpoint W.S. (Ed.), pp. 277-300, Academic Press, London.
- Himelblau E, Mira H, Lin SJ, Culotta VC, Penarrubia L, Amasino RM (1998) Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*. *Plant Phys.* 117:1227–1234
- Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S (1993) Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett.* 334:170-174.
- Horst WJ (1995) The role of apoplast in aluminium toxicity and resistance of higher plants. *Z. Pflanzenernahr. Bodenk.* 158:419-428.
- Hsu YT, Kao CH (2004) Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Grow. Reg.* 42:227-238.
- Huang TL, Huang HJ (2008) ROS and CDPK-like kinase-mediated activation of MAP kinase in rice roots exposed to lead. *Chemosphere* 71:1377-1385.
- Huie RE, Padmaja S (1993) The reaction of NO with O₂-. *Free Radical Res. Com.* 18:195-199.
- Igamberdiev AU, Lea PJ (2002) The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. *Phytochemistry* 60:651-674.
- Ischiropoulos H (2003) Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305:776-783.
- Jain R, Srivastava S, Solomon S, Shrivastava AK, Chandra A (2010) Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Acta Physiol. Plant.* 32:979-986.
- Jeandroz S, Lamotte O, Astier J, Rasul S, Trapet P, Besson-Bard A, Bourque S, Nicolas-Francès V, Ma W, Berkowitz GA, Wendehenne D (2013) There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca²⁺ signaling. *Plant Phys* 163:459-470.
- Jonak C, Nakagami H, Hirt H (2004) Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiol.* 136:3276-3283.

Jones DL, Blancaflor EB, Kochian LV, Gilroy S (2006) Spatial coordination of aluminium uptake, production of reactive oxygen species, callose production and wall rigidification in maize roots. *Plant, Cell and Environ.* 29:1309-1318.

Kádár I (2013) Szennyvizek, iszapok, komposztok, szervesstrágyák a talajtermékenység szolgálatában. MTA ATK Talajtani és Agrokémiai Intézet, Budapest.

Kampfenkel K, Kushnir S, Babiychuk E, Inze D, Van Montagu M (1995) Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J. Biol. Chem.* 270:28479–28486

Kanner J, Harel S, Granit R (1991) Nitric oxide as an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys.* 289:130-136.

Karpinski S, Reynolds H, Karpinska B, Wingsle G, Creissen G, Mullineaux P (1999) Systematic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284:654-657.

Kartusch R (2003) On the mechanism of callose synthesis induction by metal ions in onion epidermal cells. *Protoplasma* 220:219-225

Karuppanapandian T, Moon J-C, Kim C, Manoharan K, Kim W (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation signal transduction, and scavenging mechanisms. (*AJCS*) *Australian J of Crop Sci* 5(6):709-725.

Kell DB (2009) Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC medical genomics*, 2(1), 2.

Keszler A, Zhang Y, Hogg N (2010) Reaction between nitric oxide, glutathione, and oxygen in the presence and absence of protein: how are S-nitrosothiols formed? *Free Rad. Biol. Med.* 48:55-64.

Klatt P, Lamas S (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.* 267:4928-4944.

Klotz L-O (2002) Oxidant-induced signalling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biol. Cehm.* 383:443-456.

Kolbert Zs, Pető A, Lehotai N, Feigl G, Ördög A, Erdei L (2012) *In vivo* and *in vitro* studies on fluorophore-specificity. *Acta Biol. Szeged.* 56:37-41.

Kowalewska G, Falkowski L, Hoffmann SK, Szczepaniak L (1987) Replacement of magnesium by copper (II) in the chlorophyll porphyrin ring of planktonic algae. *Acta Physiol. Plant.* 9:43052.

Krupa Z, Baszynski T (1995) Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus - direct and indirect effects on light and dark reactions. *Acta Physiol Plant* 7:55-64.

Kurepa J, Hérouart D, Van Montagu M, Inzé D (1997) Differential expression of CuZn- and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress, and hormonal treatments. *Plant and Cell Physiology* 38:463–470

- Küpper H, Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP. (2000) Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* 212: 75–84.
- Krzesłowska M (2011) The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 35–51.
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:109-136.
- Lane TW, Morel FM (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:4627-4631
- Lee U, Wie C, Fernandez BO, Feelisch M, Vierling E (2008) Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:786-802.
- Lehotai N, Kolbert Zs, Pető A, Feigl G, Ördög A, Kumar D, Tari I, Erdei L (2012) Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. *J. Exp. Bot.* 15:5677-5687.
- Lehotai N, Pető A, Erdei L, Kolbert Zs (2011) The effect of selenium (Se) on development and nitric oxide levels in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Acta Biol. Szeged.* 55:105-107.
- Lequeux H, Hermans C, Lutts S, Verbruggen N (2010) Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiol. Biochem.* 48:673-682.
- Leterrier M, Airaki M, Palma JM, Chaki M, Barroso JB, Corpas FJ (2012a) Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*. *Environ. Poll.* 166:136-143.
- Leterrier M, Barroso JB, Valderrama R, Palma JM, Corpas FJ (2012b) NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from *Arabidopsis* roots contributes in the mechanism of defence against the nitro-oxidative stress induced by salinity. *Sci. World. J.* 2012:694-740.
- Leterrier M, Chaki M, Airaki M, Valderrama R, Palma JM, Barroso JB, Corpas FJ (2011) Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Sign. Behav.* 6:789-793.
- Lewitt J (1980) Response of plants to environmental stress, Acad. press, New York.
- Lidon FC, Henriques FS (1993) Effects of copper toxicity on growth and the uptake and translocation of metals in rice plants. *J. Plant Nutr.* 16:1449-1464.
- Lin Ch-Ch, Chen L-M, Liu Z-H (2005) Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Sci.* 168:855–861.
- Lin CW, Chang HB, Huang HJ (2005) Zinc induces mitogen-activated protein kinase activation mediated by reactive oxygen species in rice roots. *Plant Phys. Biochem.* 43:963-968.

- Linger P, Ostwald A, Haensel J (2005) *Cannabis sativa* L. growing on heavy metal contaminated soil: growth, cadmium uptake and photosynthesis. *Biol. Plant.* 49:567–576.
- Lopez-Huertas E, Charlton WL, Johnson B, Graham IA, Baker A (2000) Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J.* 19:6770-6777.
- Lozano-Juste J, Colom-Moreno R, Leon J (2011) In vivo tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 62:3501-3517.
- Lozano-Rodriguez E, Hernandez LE, Bonay P, Carpena-Ruiz RO (1997) Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. *J. Exp. Bot.* 48:123-128.
- Luna CM, González CA, Trippsi VS (1994) Oxidative damage caused by excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.* 35:11-15.
- Luo Y, Rimmer DL (1995) Zinc-copper interaction affecting plant growth on a metal-contaminated soil. *Environ. Pollut.* 88:79-83.
- Maeda H, DellaPenna D (2007) Tocopherol functions in photosynthetic organisms. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:260-265.
- Maksymiec W (1997) Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34:321-342.
- Maksymiec W (2007) Signaling responses in plants to heavy metals. *Acta Physiol. Plant.* 29:177-187.
- Maksymiec W, Baszinski T (1988) The effect of Cd^{2+} on the release of proteins from thylakoid membranes of tomato leaves. *Acta Soc. Bot. Pol.* 57:465-474.
- Maksymiec W, Bednara J, Baszyn'ski T (1995) Responses of runner plants to excess copper as a function of plant growth stages: effects on morphology and structure of primary leaves and their chloroplast ultrastructure. *Photosynthetica* 31:427–435.
- Maksymiec W, Krupa Z (2006) The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Exp. Bot.* 57:187–194.
- Maksymiec W, Wianowska D, Dawidowicz AL, Radkiewicz S, Mardarowicz M, Krupa Z (2005) The level of jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus vulgaris* plants under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* 162:1338-1346.
- Maksymiec W, Wianowska D, Dawidowicz AL, Radkiewicz S, Mardarowicz M, Krupa Z (2005) The level of jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus coccineus* plants under heavy metal stress. *J Plant Physiol.* 162:1338–1346.
- Malan C, Gregling MM, Gressel J (1990) Correlation between CuZn superoxide dismutase and glutathione reductase and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. *Plant. Sci.* 69:157-166.
- Malik SI, Hussain A, Yun BW, Spoel SH, Loake GJ (2011) GSNOR-mediated de-nitrosylation in the plant defence response. *Plant Sci.* 181:540-544.

- Maret W (2009) Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals. *Biometals* 22:149-157.
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. London, UK: Academic Press.
- Martí MA, Capece L, Crespo A, Doctorovich F, Estrin DA (2005) Nitric oxide interaction with phytochrome c' and its relevance to guanylate cyclase. Why does the iron histidine bond break? *J. Am. Chem. Soc.* 127:7721-7728.
- Matsui K (2006) Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:274-280.
- Matysik J, Bhalu B, Mohanty P (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr. Sci.* 82:525-532.
- May M, Vernoux T, Leaver C, van Montagu M, Inzé D (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.* 49:649-667.
- Mazhoudi S, Chaoui A, Ghorbal MH, El Ferjani E (1997) Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Sci.* 127:129-137.
- Metwally A, Finkmeier I, Georgi M, Dietz KJ (2003) Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol.* 132:272-281.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7:405-410.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9:490-498.
- Molassiotis A, Fotopoulos V (2011) Oxidative and nitrosative signaling in plants. *Plant sig. & Beha.* 6:2, 210-214.
- Møller IM (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:459-481.
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:459-481.
- Monnet F, Vaillant N, Vernay P, Coudret A, Sallanon H, Hitmi A (2001) Relationship between PSII activity, CO₂ fixation, and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. *J. Plant Phys.* 158:1137-1144.
- Mullineaux PM, Baker NR (2011) Oxidative stress: antagonistic signalling for acclimation or cell death? *Plant Physiol.* 154:521-525.
- Mur LAJ, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moskhov IE, Novikova GV, Hall MA, Harren FJM, Hebelstrup KH, Gupta KJ (2012) Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants* 5:pls052

- Muramoto T, Tsurui N, Terry MJ, Yokota A, Kohchi T (2002) Expression and biochemical properties of a ferredoxin-dependent heme oxygenase required for phytochrome chromophore synthesis. *Plant Physiol.* 130:1958-1966.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22:867-880.
- Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y (2000) Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric oxide* 4:423-430.
- Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 59:165-176.
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 53:1237-1247.
- Nieboer E, Richardson DHS (1980) The replacement of the nondescript term 'heavy metal' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut.* 1:2-26.
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 49:249-279.
- Nouairi I, Ammar WB, Yousef NB, Daoud DBM, Ghorbal NH, Zarrouk M (2006) Comparative study of cadmium effects on membrane lipid composition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* leaves. *Plant Sci.* 170:511-519.
- Olson PD, Varner JE (1993) Hydrogen peroxide and lignification. *The Plant Journal*, 4:887-892.
- Opdenakker K, Remans T, Keunen E, Vangronsveld J, Cuypers A (2012) Exposure of *Arabidopsis thaliana* to Cd or Cu excess leads to oxidative stress mediations in MAPKinase transcript levels. *Environ. Exp. Bot.* 83:53-61.
- Ötvös E, Pázmándi T, Tuba Z (2003) First national survey of atmospheric heavy metal deposition in Hungary by the analysis of mosses. *The Sci. Total Environ.* 309:151-160.
- Pacyna JM (1986) Atmospheric trace elements from natural and anthropogenic sources. Nriagu JO, Davidson CI (Ed.) *Toxic metals in the atmosphere*, Chap 2, Wiley, New York.
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Phys.* 132:1241-1248.
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lombardo MC, Lamattina L (2004) Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol* 135:279-286.
- París R, Lamattina L, Casalongué CA (2007) Nitric oxide promotes the wound-healing response of potato leaflets. *Plant Physiol. Biochem.* 45:80-86.
- Pasternak T, Rudas V, Potters G, Jansen MA (2005) Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 53:299-314.

- Pastori GM, Foyer CH (2002) Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of “redox” and abscisic acid-mediated controls. *Plant Phys* 129: 460-498.
- Peterson CA, Rauser WE (1979) Callose deposition and photoassimilate export in *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel and zinc. *Plant Physiol.* 63:1170-1174.
- Pető A, Lehotai N, Lozano-Juste J, León J, Tari I, Erdei L, Kolbert Zs (2011) Involvement of nitric oxide and auxin in signal transduction of copper-induced morphological responses in *Arabidopsis* seedlings. *Ann. Bot.* 108:449-457.
- Piantadosi CA (2002) Biological chemistry of carbon monoxide. *Antiox. Redox. Signal.* 4:259-270.
- Pich A, Scholz I (1996) Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. *J. Exp. Bot.* 47:41–47
- Pignocchi C, Kiddle G, Hernández I, Foster SJ, Asensi A, Taybi T, Barnes J, Foyer CH (2006) Ascorbate oxidase-dependent changes in the redox state of the apoplast modulate gene transcript accumulation leading to modified hormone signaling and orchestration of defense processes in tobacco. *Plant Physiol.* 141:423-435.
- Pilon M, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Gogolin KA, Ye H (2006) Copper cofactor delivery in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9:256-263.
- Pitta-Alvarez SI, Spollansky TC, Giulietti AM (2000) The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzym. Microb. Technol.* 26:252-258.
- Pitzschke A, Hirt H (2006) Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signalling in plants. *Plant Physiol.* 141:351-356.
- Poschenrieder C, Gunsé B, Barceló J (1989) Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol.* 90:1365–1371.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MA (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci.* 12:98-105.
- Pourrut B, Perchet G, Silvestre J, Cecchi M, Guiresse M, Pinelli E (2008) Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *J. Plant Physiol.* 165:571-579.
- Prado AM, Porterfield DM, Feijó JA (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* 131:2707-2714.
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6:65-74.

- Priselová B, Mistříková V, Libantová J, Moravčíková J, Matusíková I (2012) Study on metal-triggered callose deposition in roots of maize and soybean. *Biologia* 67:698-705.
- Puig S, Andres- Colas N, García- Molina A, Penarrubia L (2007) Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell Environ.* 30:271-290
- Qiao W, Li C, Fan L-M (2014) Cross-talk between nitric oxide and hydrogen peroxide in plant responses to abiotic stresses. *Environ and Exp Bot* 100:84– 93.
- Rakwal R, Tomogami S, Kodama O (1996) Role of jasmonic acid as signalling molecule in copper chloride-elicited rice phytoalexin production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60:1046-1048.
- Rathore VS, Bajaj YPS, Wittwer SH (1972) Subcellular localization of zinc and calcium in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) tissues. *Plant Physiology* 49: 207–211.
- Rausser WE (1984) Estimating metallothionein in small root samples of *Agrostis gigantea* and *Zea mays* exposed to cadmium. *J. Plant Phys.* 116:253-260.
- Reichman SM (2002) The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc. *Australian Mineral & Energy Environment Foundation*, Occasional Paper No. 14 p 22.
- Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS (2000) Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 275:32460-32466.
- Rentel M, Knight MR (2004) Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135:1471–1479.
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397:694–697
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza ANA, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant Cell Environ.* 29:1532-1544.
- Romero-Puertas MC, Laxa M, Matte A, Zaninotto F, Finkmeier I, Jones AM, Perazzolli M, Vandelle E, Dietz KJ, Delledonne M (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* 19:4120-4130.
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O_2^- and H_2O_2 in pea leaves. *Plant Cell Environ.* 27:1122–1134.
- Rout GR, Das P (2003) Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie-Sci.des Prod. Vege. et de l'Envi.* 23:3-12.
- Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation.

Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.* 269:26066-26075.

Rucinska R, Waplak S, Gwozdz EA (1999) Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiol. Biochem.* 37:187–194.

Rucinska R, Waplak S, Gwozdz EA (1999) Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiol. Biochem.* 37:187-194.

Saldago I, Martínez MC, Oliveira C, Frungillo L (2013) Nitric oxide signaling and homeostasis in plants: a focus on nitrate reductase and S-nitrosogluthathione reductase in stress-related responses. *Braz. J. Bot.* 36(2):89-98.

Sancenon V, Puig S, Mateu-Andres I, Dorcey E, Thiele DJ, Penarrubia L (2004) The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *J. Biol. Chem.* 279:15348–15355

Sancenon V, Puig S, Mira H, Thiele DJ, Penarrubia L. (2003) Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 51:577–587

Sandmann G, Böger P (1980) Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Plant Physiol.* 66:797–800.

Sarret G, Harada E, Choi YE, Isaure MP, Geoffroy N, Fakra S, Marcus MA, Birschwilks M, Clemens S, Manceau A (2006) Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds. *Plant Phys.* 141:1021-1034.

Sasaki M, Yamamoto Y, Matsumoto H (1996) Lignin deposition induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Physiol. Plant.* 96:193-198

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tineves JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9:676-682.

Schopfer FJ, Baker PR, Freeman BA (2003) NO-dependent protein nitration: A cell signalling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem. Sci.* 28:646-654.

Schopfer P (2001) Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *Plant J.* 28:679-688.

Schopfer P, Plachy C, Frahy G (2001) Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin and abscisic acid. *Plant Physiol.* 125:1591-1602.

Schützendübel A, Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. of Exp. Bot.* 53:1351-1365.

Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol.* 127:887-898.

- Sgherri C, Quartacci MF, Navari-Izzo F (2007) Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess. *J. Plant Physiol.* 164:1152-1160.
- Sharma SS, Dietz KJ (2006) The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J. Exp. Bot.* 57:711-726.
- Sharma SS, Dietz K-J (2008) The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Sci.* 14.1:43-50.
- Sharma SS, Dietz, K-J (2008) The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.* 14:43-50
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessaralki M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 1-26.
- Shi QH, Zhu ZJ (2008) Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environ. Exp. Bot.* 63:317-326.
- Shier WT (1994) Metals as toxins in plants, *J. Toxicol.- Toxin Rev.* 13:205-216.
- Siedlecka A (1995) Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Soc. Bot. Pol.* 64:265-272.
- Signorelli S, Corpas FJ, Borsani O, Barroso JB, Monza J (2013) Water stress induces a differential and spatially distributed nitro-oxidative stress response in roots and leaves of *Lotus japonicus*. *Plant Sci.* 201:137-146.
- Sinclair SA, Sherson SM, Jarvis R, Camarakis J, Cobbett CS (2007) The use of the zinc-fluorophore, Zinpyr-1, in the study of zinc homeostasis in *Arabidopsis* roots. *New Phytol.* 174:39-45.
- Singh S, Singh S, Ramachandran V, Eapen S (2010) Copper tolerance and response of antioxidative enzymes in anelexically grown *Brassica juncea* (L.) plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73:1976-1981.
- Skorzynska E, Baszynski T (1993) The changes in PSII complex polypeptides under cadmium treatment are they of direct or indirect nature. *Acta Physiol. Plant.* 15:263-269.
- Smith JM, Dasgupta TP (2000) Kinetics and mechanism of the decomposition of S-nitrosoglutathione by ascorbic acid and copper ions in aqueous solution to produce nitric oxide. *Nitric Oxide* 4:57-66.
- Smirnoff M (1995) Antioxidant systems and plant response to the environment. Environmental and plant metabolism: flexibility and acclimation. *Bios Scientific Publishers*, Oxford, UK, 217-243.
- Stamler JS (1994) Redox signalling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78:931-936.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258:1898-1902.
- Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel P (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212: 835-841.

- Stöhr C, Ullrich WR (2002) Generation and possible roles of nitric oxide in plant roots and their apoplastic space. *J. Exp. Bot.* 53:2293-2303.
- Tada Y, Spoel SH, Pajeroska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X (2008) Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321:952-956.
- Tanou G, Filippou P, Belghazi M, Job D, Diamantidis G, Fotopoulos V, Molassiotis A (2012) Oxidative and nitrosative-based signalling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *The Plant J.* 71:585-599.
- Taylor GJ, Foy CD (1985) Differential uptake and toxicity of ionic and chelated copper in *Triticum aestivum*. *Can. J. Bot.* 63:1271-1275.
- Taylor LP, Grotewold E (2005) Flavonoids as developmental regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:317-323.
- Taylor NG (2008) Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. *New Phytol.* 178:239-252.
- Tsugane K, Kobayashi K, Niwa Y, Ohba Y, Wada K, Kobayashi H (1999) A recessive *Arabidopsis* mutant that grows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell* 11:1195-1206.
- Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143:606-616.
- Turner RG, Marshall C (1972) The accumulation of zinc by subcellular fractions of roots of *Agrostis tenuis* Sibth. in relation to zinc tolerance. *New Phyt.* 71:671-676.
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Fernandez-Ocana A, Chaki M, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Colmenero-Varera P, del Río LA, Barroso JB (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters* 581:453-461.
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Gómez-Rodríguez MV, Chaki M, Pedrajas JR, Fernández-Ocana A, del Río L, Barroso JB (2006) The dehydrogenase mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt induced oxidative stress in olive plants. *Plant, Cell and Environ.* 29:1449-1459.
- Valko MMHCM, Morris H, Cronin MTD (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12:1161-1208.
- van de Mortel JE, Villanueva LA, Schat H, Kwekkeboom J, Coughan S, Moerland PD, van Themaat EVL, Koornneef M, Aarts MGM (2006) Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and related heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.* 142:1127-1147.
- Vandelle E, Delledonne M (2011) Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Sci.* 181:534-539.

- Vecchia FD, La Rocca N, Moro I, De Faveri S, Andreoli C, Rascio N (2005) Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. *Plant Sci.* 168:329–338.
- Verkleji JAS (1993) The effects of heavy metals stress on higher plants and their use as bio monitors. Markert B. (Ed.) *Plants as bioindicators: indicators of heavy metal sin the terrestrial environment*, VCH, New York, 415-424.
- Vierke G, Struckmeier P (1977) Binding of copper (II) to proteins of the photosynthetic membrane and its correlation with inhibition of electron transport in class II chloroplasts of spinach. *Z Naturforsch* 32:605–610
- Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53:1227-1236.
- Wasternack C (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* 100:681-697.
- White MC, Baker FD, Chaney RL, Decker AM (1981) Metal complexation in xylem fluid. II. Theoretical equilibrium model and computational computer program. *Plant Physiol.* 67:301-310.
- Wierzbicka M (1999) The effect of lead on the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* L. *Protoplasma* 207:186–194.
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ.* 31:622-631.
- Wink DA, Cook JA, Pacelli R, Liebmann J, Krishne MC, Mitchell JB (1995) Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* 82/83:221-226.
- Wintz H, Fox T, Wu YY, Feng V, Chen W, Chang HS, Zhu T, Vulpe C (2003) Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J. Biol. Chem.* 278:47644-47653.
- Wojtaszek P (2000) Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Phytochem.* 54:1-4.
- Xiong J, An L, Lu H, Zhu C (2009) Exogenous nitric oxide enhances cadmium tolerance of rice by increasing pectin and hemicellulose contents in root cell wall. *Planta* 230:755-765.
- Xiong J, Fu G, Tao L, Zhu C (2010) Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 497:13-20.
- Xu J, Yin H, Li Y, Liu X (2010) Nitric oxide is associated with long-term zinc tolerance in *Solanum nigrum*. *Plant Physiology* 154: 1319–1334.
- Xu YC, Zhao BL (2003) The main origin of endogenous NO in higher non-leguminous plants. *Plant Physiol Biochem* 41:833-838.
- Yang ZY, Chen FH, Juan JG, Zeng ZW, Wong MH (2004) Responses of *Sesbania rostrate* and *S. cannabina* to Pb, Zn, Cu and Cd toxicities. *J. Environ. Sci.* 16:670-673.

Yeh CM, Chien PS, Huang HJ (2007) Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *J. Exp. Bot.* 58:659-671.

Yun BW, Feechan A, Yin M, Saidi NB, Le Bihan T, Yu M, Moore JW, Kang JG, Kwon E, Spoel SH, Pallas JA, Loake GJ (2011) S-Nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* 478:264-268.

Zawoznik MS, Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP (2007) Endogenous salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 173:190-197.

Zhang S, Klessig DF (2001) MAPK cascades in plant defense signalling. *Trends Plant Sci.* 6:520-527.

Zhao J, Fujita K, Sakai K (2007) Reactive oxygen species, nitric oxide, and their interactions play different roles in *Cupressus lusitanica* cell death and phytoalexin biosynthesis. *New Phytol.* 175:215-229.

Zou T, Zheng LP, Yuan HY, Yuan YF, Wang JW (2012) The nitric oxide production and NADPH-diaphorase activity in root tips of *Vicia faba* L. under copper toxicity. *Plant Omics J.* 5:115-121.

X. Publikációs lista

Tudományos közlemények referált folyóiratban

(A ★-gal jelölt közlemények közvetlenül kapcsolódnak a Ph.D. értekezéshez)

- **Gábor Feigl**, Réka Szöllősi, Erzsébet Mihalik (2010) Studies on established *Acorus calamus* (L.) populations.
Acta Biologica Szegediensis Volume 54, Number 2, 2010.
- Zsuzsanna Kolbert, Andrea Pető, Nóra Lehotai, **Gábor Feigl**, Attila Ördög, László Erdei (2012) In vivo and in vitro studies on fluorophore-specificity.
Acta Biologica Szegediensis. 56(1):37-41.
- Zsuzsanna Kolbert, Andrea Pető, Nóra Lehotai, **Gábor Feigl**, László Erdei (2012) Long-term copper (Cu²⁺) exposure impacts on auxin, nitric oxide (NO) metabolism and morphology of *Arabidopsis thaliana* L.
Plant Growth Regulation. 68(2): 151- 159. IF: 1,67
- Nóra Lehotai, Zsuzsanna Kolbert, Andrea Pető, **Gábor Feigl**, Devanand Kumar, Irma Tari, László Erdei (2012) Selenite-induced hormonal and signalling mechanism during root growth of *Arabidopsis thaliana* L.
Journal of Experimental Botany, Vol. 63, 15:5677-5687. IF: 5,24
- ★ **Gábor Feigl**, Devanand Kumar, Nóra Lehotai, Nóra Tugyi, Árpád Molnár, Attila Ördög, Ágnes Szepesi, Katalin Gémes, Gábor Laskay, László Erdei, Zsuzsanna Kolbert (2013) Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress.
Ecotoxicology and Environmental Safety, 94 (2013) 179–189. IF: 2,482
- Andrea Pető, Nóra Lehotai, **Gábor Feigl**, Nóra Tugyi, Attila Ördög, Katalin Gémes, Irma Tari, László Erdei, Zsuzsanna Kolbert (2013) Nitric oxide contributes to copper tolerance by influencing ROS metabolism in *Arabidopsis*.
Plant Cell Reports, 32(12), 1913-1923. IF: 2,93
- **Gábor Feigl**, Devanand Kumar, Nóra Lehotai, Árpád Molnár, Éva Rácz, Attila Ördög, László Erdei, Zsuzsanna Kolbert, Gábor Laskay (2015) Comparing the effects of excess copper in the leaves of *Brassica juncea* (L. Czern) and *Brassica napus* (L.) seedlings: growth inhibition, oxidative stress and photosynthetic damage.
Acta Biologica Hungarica 66(2), pp. 205–221. IF: 0,589
- ★ **Gábor Feigl**, Nóra Lehotai, Árpád Molnár, Attila Ördög, Marta Rodríguez-Ruiz, José M. Palma, Francisco J. Corpas, László Erdei, Zsuzsanna Kolbert (2015) Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the roots of two *Brassica* species with different sensitivity to zinc stress.
Annals of Botany – elfogadva, doi: 10.1093/aob/mcu246. IF: 3,654

- Zsuzsanna Kolbert, Andrea Pető, Nóra Lehotai, **Gábor Feigl**, László Erdei (2015) Copper sensitivity of *nialnia2noal-2* mutant is associated with its low nitric oxide (NO) level.

Plant Growth Regulation – elfogadva, doi: 10.1007/s10725-015-0059-5. IF: 1,67

- **Gábor Feigl**, Zsuzsanna Kolbert, Nóra Lehotai, Árpád Molnár, Attila Ördög, Ádám Bordé, Gábor Laskay, László Erdei – Different zinc sensitivity of *Brassica* organs is accompanied by distinct responses in protein nitration level and pattern.

Biometals (IF: 2,503), benyújtva

- Lehotai Nóra, Lyudmila Lyubenova, Peter Schröder, **Feigl Gábor**, Ördög Attila, Szilágyi Kristóf, Erdei László, Kolbert Zsuzsanna - Nitro-oxidative stress contributes to selenite toxicity in pea (*Pisum sativum* L.)

Plant and Soil (IF: 3,235) benyújtva

Könyvfejezet

- Tugyi Nóra, Pető Andrea, Lehotai Nóra, **Feigl Gábor**, Erdei László, Kolbert Zsuzsanna: A nitrogén-monoxid és a prolin kapcsolatának vizsgálata *Arabidopsis thaliana* L. növényekben réz stressz alatt.

A biológia jövője, a jövő biológusai, avagy szemelvények a magyarországi felsőoktatási intézményekben végzett tudományos munka eredményeiből. 2014, JATEPress, Szeged. (ISBN: 978 963 315 212 6)

Konferencia előadások

- **Gábor Feigl** - Réka Szöllősi - Erzsébet Mihalik: Telepített kálmos (*Acorus calamus* L.) populációk vizsgálata.

Lippay János - Ormos Imre - Vas Károly Scientific Symposium, Section of Medicinal Plant Science, 28-30 October, 2009, Corvinus University of Budapest.

- Ágnes Szepesi, Ágnes Gallé, Jolán Csiszár, Szilvia Brunner, Dániel Benyó, **Gábor Feigl**, Edit Horváth, Ágnes Szabó-Hevér, Ákos Mesterházy, Irma Tari, László Erdei: Non-enzymatic antioxidant responses of wheat flag leaves after *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* infections.

HURO/0901/147/2.2.2 Szeged - Timisoara Axis for the Safe Food and Feed SZETISA1, 15-16 May 2012, Szeged, Hungary

- **Gábor Feigl**, Devanand Kumar, Andrea Pető, Nóra Lehotai, Ágnes Szepesi, László Erdei, Zsuzsanna Kolbert (2012) Studying the effect of copper in *Brassica juncea* and *Brassica napus* root tips: metabolism of reactive oxygen and nitrogen species and morphological adaptation.

7th Scandinavian Plant Physiology Society PhD Student Conference, 12-15 September, Laulasmaa, Estonia

- **Gábor Feigl**, Devanand Kumar, Andrea Pető, Nóra Lehotai, Attila Ördög, Árpád Molnár, Zsuzsanna Kolbert, László Erdei (2012) The effect of zinc on the microelement homeostasis and the metabolism of reactive signal molecules in *Brassica juncea* and *Brassica napus*.

Third Annual Workshop of COST Action FA 0905 – Mineral improved crop production for healthy food and feed, 23-26 October, Lisbon, Portugal

- Lehotai N, Lyubenova L, Drews N, Ördög A, **Feigl G**, Kolbert Zs, Erdei L, Schröder P (2012) The possibilities and enzymatic background of Se and Zn biofortification of pea plants. Third Annual Workshop of COST Action FA 0905 – Mineral improved crop production for healthy food and feed, 23-26 October, Lisbon, Portugal
- Edit Horváth, Zsuzsanna Kolbert, Nóra Lehotai, **Gábor Feigl**, Irma Tari, László Erdei: Role of reactive oxygen- and nitrogen species in poplar plants during zinc, copper and polyethylene glycol treatments. HUSRB/1002/214/036 "OXIT" – Characterization and oxidative stress tolerance in plants: from models to trees – Interim conference, 20. November 2012, Szeged, Hungary
- Lehotai N, Pető A, **Feigl G**, Ördög A, Tugyi N, Molnár Á, Lyubenova L, Schröder P, Kolbert Zs, Erdei L (2013) Selenium induced stress responses in *Arabidopsis thaliana* and *Pisum sativum* plants: the possibilities of biofortification. Societas Biologiae Plantarum Hungarica, Conference of Young Biologists, 25 January 2013 Szeged, Hungary.
- Horváth E, Kolbert Zs, Lehotai N, **Feigl G**, Tari I, Erdei L (2013) Role of reactive oxygen- and nitrogen species in poplar plants during abiotic stresses. IPA OXIT Conference: Oxidative stress tolerance in plants: from models to trees (OXIT) HUSRB/1002/214/036. 14-15. November 2013, Novi Sad, Serbia.
- Lehotai N, **Feigl G**, Koós Á, Erdei L, Kolbert Zs. (2014) Cytokinin-nitric oxide relationship in selenium-stressed *Arabidopsis*. Societas Biologiae Plantarum Hungarica, Conference of Young Biologists, 30 January 2014, Budapest, Hungary.
- **Feigl G**, Lehotai N, Molnár Á, Rodríguez-Ruiz M, Palma JM, Corpas FJ, Erdei L, Kolbert Zs (2014) Zinc induced a nitro-oxidative stress in roots of *Brassica* species. 5th Plant NO Club Meeting, 24-25 July 2014, Munich, Germany
- Kolbert Zs, Pető A, Lehotai N, **Feigl G**, Erdei L (2014) Growth responses induced by microelement excess: the role of reactive nitrogen species. Societas Biologiae Plantarum Hungarica, 11th Congress, 2014. augusztus 27-29., Szeged, Magyarország.
- **Feigl G**, Pető A, Lehotai N, Molnár Á, Erdei L, Kolbert Zs (2014) Nehézfém indukált nitro-oxidatív stressz *Brassica* fajokban. SZAB Biológiai Szakbizottság ünnepi ülése, Reprezentatív előadások a Biológiai Munkabizottságok kutatási területeiről, 2014. november 26., Szeged, Magyarország
- Zsuzsanna Kolbert, **Gábor Feigl**, Árpád Molnár, László Erdei (2015) Growth responses induced by microelement excess: the role of reactive nitrogen species. HUSRB/1203/221/173 „PLANTTRAIN” Opening Conference, 20-21 April, 2015, Szeged, Magyarország
- Kolbert Zsuzsanna, **Feigl Gábor**, Molnár Árpád, Bordé Ádám, Erdei László (2015) A reaktív nitrogénformák szerepe és interakciói a stressz-indukált növekedési válaszok során. MNBT közgyűlése, 2015. május 8, Budapest, Magyarország
- **Gábor Feigl** (2015) The role of nitric oxide in stress acclimation of plants. HUSRB/1203/221/173 „PLANTTRAIN” Seminar and Workshops in Novi Sad, 8-12 June, 2015, Novi Sad, Serbia

Konferencia poszterek

- Lehotai N, Pető A, **Feigl G**, Kumar D, Erdei L, Kolbert Zs (2012) Early responses in root meristem of *Pisum sativum* and *Arabidopsis thaliana* induced by copper and selenium
Second Annual Conference and MC Meeting COST Action FA 0905, Mineral Improved Crop Production for Healthy Food and Feed. 23-26 November 2012, Venice, Italy.
- Zsuzsanna Kolbert, Nóra Lehotai, Andrea Pető, **Gábor Feigl**, Devanand Kumar, László Erdei (2012) Selenium-Induced Growth Responses and Their Hormonal Background.
International Conference Plant Growth, Nutrition & Environment Interactions, 18-21 February 2012, Wien, Austria
- Lehotai Nóra, Pető Andrea, **Feigl Gábor**, Devanand Kumar, Erdei László, Kolbert Zsuzsanna (2012) Study of selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. by light- and fluorescence microscopy.
7th Scandinavian Plant Physiology Society PhD Student Conference, 12-15 September 2012, Laulasmaa, Estonia
- Zsuzsanna Kolbert, Andrea Pető, Nóra Lehotai, **Gábor Feigl**, Nóra Tugyi, Attila Ördög, László Erdei (2013) Relationship between nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) in copper-treated *Arabidopsis* roots.
SEB Annual Main Meeting, 3-6 July 2013, Valencia, Spain
- Zsuzsanna Kolbert, Nóra Lehotai, Andrea Pető, **Gábor Feigl**, Nóra Tugyi, László Erdei (2013) Cytokinin overproducing *ipt6-1 Arabidopsis* shows altered NO generation and insensitivity to selenite.
11th International POG Conference, 17-19 July 2013, Warsaw, Poland
- **Feigl G**, Pető A, Lehotai N, Molnár Á, Erdei L, Kolbert Zs (2013) Comparison of the effect of copper and zinc in *Brassica juncea* and *Brassica napus* roots: Microelement homeostasis, metabolism of reactive signal molecules and morphological adaptation.
Biomedica Miniconference, 13 December 2013, Szeged, Hungary.
- Lehotai N, **Feigl G**, Koós Á, Pető A, Erdei L, Kolbert Zs (2013) Relationship between cytokinin and nitric oxide in selenium treated *Arabidopsis* plants.
Biomedica Miniconference, 13 December 2013, Szeged, Hungary.
- **Feigl G**, Lehotai N, Molnár Á, Erdei L, Kolbert Zs (2014) Zinc excess affects root architecture and reactive oxygen- and nitrogen species metabolism in *Brassica juncea* and *Brassica napus*.
Society for Experimental Biology Annual Main Meeting, 1-3 July 2014, Manchester, United Kingdom
- Lehotai N, **Feigl G**, Koós Á, Erdei L, Kolbert Zs (2014) Cytokinin-nitric oxide interaction: an antagonistic relationship in selenite-exposed *Arabidopsis*.
Society for Experimental Biology Annual Main Meeting, 1-3 July 2014, Manchester, United Kingdom
- **Feigl G**, Lehotai N, Molnár Á, Erdei L, Kolbert Zs (2014) Detection of protein tyrosine nitration in zinc-treated *Brassica* plants.
Societas Biologiae Plantarum Hungarica, 11th Congress, 2014. augusztus 27-29., Szeged, Magyarország.
- Lehotai N, **Feigl G**, Koós Á, Pető A, Erdei L, Kolbert Zs (2014) The role of nitric oxide under selenium tolerance.
Societas Biologiae Plantarum Hungarica, 11th Congress, 2014. augusztus 27-29., Szeged, Magyarország.

- Molnár Á, **Feigl G**, Lehotai N, Erdei L, Kolbert Zs (2014) Microscopic study of zinc localization in *Brassica* roots.
Societas Biologiae Plantarum Hungarica, 11th Congress, 2014. augusztus 27-29., Szeged, Magyarország.

Díjak és elismerések

- Nemzeti Kiválóság Program, Apáczai Csere János Doktoranduszi Ösztöndíj, 2013. július – 2014. július (Kiváló minősítés)
- SZTE Tehetségpont Kiválósági Lista, Doktorandusz kategória, bronz fokozat, 2013, 2014
- Campus Hungary Rövid Tanulmányút, Society for Experimental Biology Annual Meeting, Manchester, 2014. július 1-3.
- Travel Grant of the SEB Annual Main Meeting, 2014
- Campus Hungary Szakmai Gyakorlat, Estación Experimental del Zaidín, Granada, Spanyolország, 2013. február – 2013. június
- Travel Grant of the 7th SPPS PhD Student Conference, 2012
- Az SZTE TTIK által rendezett 2010. év őszi Tudományos Diákköri Konferencia, Növénybiológiai Szekció, III. hely

XI. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsannának és Prof. Dr. Erdei Lászlónak a doktoranduszi éveim alatt nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért. Látásmódjuk és iránymutatásaik segítségével elindulhattam a kutatói pályán, számos lehetőséget kaptam nemzetközi és hazai konferenciákon való részvételre, magam kipróbálására. Hatalmas szakmai tapasztalatuknak, tudásuknak köszönhetően eredményeinket színvonalas publikációkként tudtuk megjelentetni. Köszönöm felbecsülhetetlen munkájukat, türelmüket és odafigyelésüket!

Köszönöm Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irma Tanszékvezető egyetemi docensnek a kedves támogatását és a belém vetett hitét, amik lehetővé tették a Ph.D. tanulmányaim elvégzését és a dolgozatom megírását, valamint a Növénybiológiai Tanszék munkájában való további részvételemet.

Köszönettel tartozom munkacsoportom két, azóta már a két bűvös betűvel gazdagabb tagjának, Megyeriné Dr. Pető Andreának és Dr. Lehotai Nórának az évek során nyújtott szakmai és emberi támogatást. A Hercegnőnek köszönöm továbbá feltétlen barátságát és szeretetét, na meg a számtalan helybéli és külföldi kalandot!

Köszönöm szakdolgozóinknak, Tugyi Nórának, Koós Ágnesnek, Rácz Évának, Molnár Árpádnak, Szilágyi Kristófnak és Bordé Ádámnak a kísérletek megvalósításában nyújtott segítségüket, és hogy együtt dolgozhattunk.

Köszönettel tartozom a Tanszék valamennyi volt és jelenlegi dolgozójának, akik bármilyen formában segítettek munkámat; külön hálával tartozom a technikai és adminisztratív munkatársaknak, akik fáradhatatlanul segítettek eligazodni a bürokrácia és a laboratóriumok útvesztőiben.

Örök hálával tartozom szeretteimnek és barátaimnak, akik kétkedés nélkül támogattak az idáig vezető, nem mindig sima úton.

I would like to express my gratitude to José Manuel Palma Martínez, Francisco Javier Corpas, Marta Rodríguez Ruiz and Carmelo Ruiz at the Estación Experimental del Zaidín in Granada, for all their help, supervision, theoretical support, and also to the entire group for their kindness and hospitality.

Végezetül szeretném megköszönni a Nemzeti Kiválóság Programnak (Apáczai Csere János Ösztöndíj), a Balassi Intézetnek (Campus Hungary Ösztöndíj Program), az OTKA PD100504, a HURO/0901/147/2.2.2 SZETISA 1. valamint a HUSRB/1203/221/173 „PLANTTRAIN” pályázatoknak, hogy anyagi és infrastrukturális támogatásukkal lehetővé tették kísérleteim korszerű eszközökön való elvégzését, új módszerek elsajátítását és nemzetközi kapcsolatok kiépítését.